



## **FLUORESCERANDE ANA TESTSYSTEM**

**För diagnostisk användning in vitro**  
**För yrkesmässigt bruk**

*AVSEDD ANVÄNDNING: Det här är ett fluorescerande antikroppstest för halvkvantitativ detektion av antinukleär antikropp i humanserum. Detta testsystem skall användas som ett hjälpmedel för detektion av antikroppar som är associerade med systemiska reumatiska sjukdomar.*

### **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 med hjälp av immunofluorescerande teknik påvisar ett fåtal utvalda nukleärproteinspecificiteter (1). Tack vare det höga sambandet mellan positiv ANA och systemisk lupus erytematosus (SLE) utesluter negativ ANA i huvudsak sjukdomen (2).

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

ANA-testkänsligheten varierar beroende på vilken typ av substrat och vilka fixativprocedurer som används samt vilka ANA-typer som finns i sera. Cellkultursubstrat visar i allmänhet större känslighet än vävnadssektioner (21-24).

Immuno Concepts ANA-testsystem med mitotiska\* humanepiteloidceller (HEp-2) är ett avancerat immunofluorescerande system för detektion av ANA. HEp-2-celler med mitotiska former har visats sig ha större känslighet och ger skarpare mönsterigenkänning än klassiskt musnjuresubstrat för detektion av antikroppar vid progressiv systemisk skleros (PSS) (25). Mitotiska former gör det lättare att känna igen olika mönster och att upptäcka tidigare orapporterade nukleära antigener som förekommer i högre koncentrationer i mitotiskt aktiva celler (26-28).

### **TESTPRINCIP**

Immuno Concepts fluorescerande ANA-testsystem använder den indirekta fluorescerande antikropptechnik som först beskrivits av Weller och Coons (29). Patientproverna odlas 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 antikropp konjugerad med fluorescein. Om resultatet är positivt bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en fluorescerande antikropp bunden till en human antinukleär antikropp, som i sin tur är bunden till en nukleär antigen.

Detta komplex kan betraktas i fluorescerande mikroskop. I positiva prover uppvisar cellkärnorna en äppelgrön fluorescens med ett färgmönster som är karaktäristiskt för den aktuella nukleära antigen distributionen i cellerna. Om provet är ANA-negativt, uppvisar cellkärnan inte något klart urskiljningsbart mönster av nukleär fluorescens.

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

# SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

**Användning:** Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten 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-bufferten förvaras i skruvlockbehållare och lagras mellan 2-25°C.

**Stabilitet:** Komponenterna är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd ingen komponent efter dess 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 giffri 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-cells substrat. 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-cells substrat. 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-cells substrat.

**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-cells substrat. 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 urskilningsbart nukleärt färgningsmönster.

**Fluorescerande antikroppreagens [CONJFITC]:** Katalognr 2009 (9,0 ml), 2075 (23 ml), 2009CS (9,0 ml), 2075CS (23 ml). Antihuman IgG konjugerade med fluorescein isotiocyanat (FITC). Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser.

## 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  
Coplin-kärl eller färgningsskålar  
Klämflaska eller Pasteur-pipetter  
Serologiska pipetter  
Enlitors behållare (för PBS-buffert)  
Avjoniserat eller destillerat vatten  
Provrör för att framställa serumspädningar  
Läskpapper eller pappershanddukar  
Inkubationskammare  
Engångshandskar  
Laborietidur  
Fluorescerande mikroskop utrustat med 495 nm matarfilter och 515 nm spärrfilter

## FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av mänskligt ursprung som använts i den här produkten har testats med FDA-godkända metoder och visat sig vara negativt (inte upprepande 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 bör allt satsmaterial hanteras som potentiellt smittsamt.
2. Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 bör hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsainstitut: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparledningar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras, skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att avlägsna eventuella rester från avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Satsen är avsedd för in vitro-diagnostiskt bruk.
6. Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas skall inaktiverat 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 eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
8. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
11. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat.
12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och sköljas noggrant före användning. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
13. Placera alla reagenser, objektglas och prover i rumstemperatur (18-25°C) före användning.
14. Använd engångshandskar vid hantering av prov och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
15. Mikrobiell kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
16. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.

## PROVTAGNING

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

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

**Förvaring:** Sera kan förvaras i 2-10°C under max en vecka. Om analysen dröjer ytterligare skall sera frysas i -20°C eller lägre. Sera bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerum.

**VARNING:** Upprepad frysning/upptining av patientprov 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 ljust äppelgrön fluorescens i cellkärnorna, med ett klart urskiljningsbart mönster som är karaktäristiskt för det kontrollserum som används. Den negativa kontrollen bör uppvisa låg intensitet och en ospecifik matt grön fluorescens i både cytoplasman och kärnan, men utan ett urskiljningsbart mönster av nukleär färgning. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av antikroppreagensen och bör inte uppvisa någon grön fluorescens. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

### TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:40. Antikroppnivåns ändpunkt är den första brunn i vilken ett klart urskiljningsbart nukleärt färgningsmönster är synligt. Vi rekommenderar denna metod för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde ( $\pm$  en spädning på var sida om medelvärdet) som fastställts för detta lotnummer fastställdes i vårt laboratorium och uppges för vägledning. Kontrollen tillhandahålls för att varje laboratorium skall ha tillgång till ANA-testningens reproducerbarhet (precision). Eftersom kontrollen inte är avsedd som indikator på antikroppnivåns precision, bör varje laboratorium fastställa sitt eget medelvärde för antikroppnivåns ändpunkt för provet i fråga och använda denna information för att få tillgång till reproducerbarheten (precisionen) mellan olika serier.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll, med användning av Immuno Concepts fluorescerande ANA-testsystem har ett medelantikroppvärde fastställts för varje lotnummer. Lotnumret och antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde ( $\pm$  en dubbel spädning på var sida om medelvärdet) står angivna på ampullens etikett, och bör användas som vägledning för testsystemets prestanda.

Det är viktigt att inte blanda ihop fluorescensens intensitet med eventuell förekomst av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn när man fastställer om en given serumspädning är positiv eller inte är om det finns ett klart urskiljningsbart mönster, oavsett den fluorescerande färgningens intensitet.

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

De värden som erhållits i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Faktorer som kan påverka resultaten omfattar, men är inte begränsat till:

1. Vilken typ av ljuskälla som används. Ljuskällor av kvicksilver ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts/halogen. Ljuskällor av kvicksilver på 50 watt, 100 watt och 200 watt skiljer sig något i exciteringsenergi vid 495 nm. Kvarts-/halogenljuskällor på 100 watt ger högre exciteringsenergi vid 495 nm än kvarts-/halogenljuskällor på 50 watt.
2. Ljuskällans skick och ålder. Detta gäller framför allt ljuskällor av kvicksilver som i allmänhet uppvisar en gradvis minskning i exciteringsenergi vid 495 nm, innan de smälter ned. Denna gradvisa minskning i exciteringsenergi kan leda till en avsevärd förlust i känslighet över flera veckors tid. Problemet kan undvikas genom att föra en tidsloggbok. För bästa resultat: Byt ut 50 watts glödlampor av kvicksilver efter 100 timmar och 100 eller 200 watts glödlampor av kvicksilver efter 200 timmar. Kvarts-/halogenljuskällor uppvisar i allmänhet ingen gradvis minskning i exciteringsenergin, innan de smälter ned.

3. Vilken typ av matarfilter som används. Störningsmatarfilter ger större känslighet över en mycket smalare våglängd än absorptionsmatarfilter. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
4. Korrekt placering av mikroskopets ljusbana. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet för mer information.
5. Objektivets numeriska bländaröppning. Med infallande ljusfluorescens (Epi) ökar fluorescensen exponentiellt, medan den numeriska bländaröppningen (NA) ökar additivt. Detta kan leda till att ett 40 gångers objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40 gångers objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
6. Spärrfilter. Spärrfiltret minskar de specifika exciteringsvåglängderna och kan användas för att minska känsligheten. Se bruksanvisningen till det fluorescerande mikroskopet eller kontakta säljaren för mer information.
7. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas utförande.

### TOLKNING AV TESTRESULTATEN

200 gångers total förstoring rekommenderas för screening av positiv/negativ, medan 400 gångers total förstoring rekommenderas för mönsterigenkänning och på visning 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 en svag färgning, med tydligare 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 läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:40. Den första brunnen med ett klart urskiljningsbart mönster är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna metod för att fastställa antikroppsnivåns ändpunkter. Det är viktigt att inte blanda ihop färgningens intensitet med eventuell förekomst av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn för fastställande om en given serumspädning är positiv eller inte är om det finns ett klart urskiljningsbart nukleärt mönster, oavsett färgningens intensitet.

**VARNING:** Vissa 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 (30).

## FLUORESCENSENS INTENSITET

Fluorescensens intensitet kan semikvantifieras enligt de riktlinjer för fluorescerande antikroppreagenser som Centralerna för kontroll och förebyggande av sjukdom, Atlanta, Georgia, USA (CDC) har fastställt.

- 4+ Lysande gulgrön (maximal fluorescens): Tydlig cellkontur. Klart definierat cellcentrum.
- 3+ Mindre lysande gulgrön fluorescens: Tydlig cellkontur. Klart definierat cellcentrum.
- 2+ Avgränsat cellmönster, men svag fluorescens: Cellkonturen mindre väldefinierad.
- 1+ Mycket dämpad fluorescens: Cellkonturen är i de flesta fall nästan omöjlig att skilja från cellens centrum.

Ett standardobjektglas för fastställande av fluorescensens intensitet, FITC QC Slide™, katalognummer 1900, kan beställas från Immuno Concepts, N.A. Ltd.

## RAPPORTERING AV RESULTATET

**Screening:** Resultatet skall rapporteras som starkt positivt eller positivt vid spädning 1:40, och det nukleära färgmönstret skall rapporteras.

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

## MÖNSTERDETEKTION

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

*Synonymer:* Diffus, fast.

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

*Sjukdomssamband:* Höga antikroppnivåer tyder på SLE. Låga antikroppnivåer tyder på SLE eller annan bindvävssjukdom (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, interfaskärnornas.

*Synonymer:* Kantig, raggig, hinnaktig.

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

*Sjukdomssamband:* Höga antikroppnivåer tyder på SLE. Lägre antikroppnivåer tyder på SLE eller annan bindvävssjukdom (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 karakteriserade.

*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<sup>§</sup>-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.

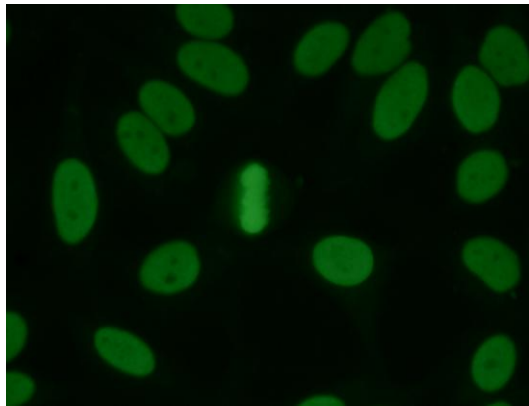
*Nukleära antigener:* Kromosom centromer (kinetochore).

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

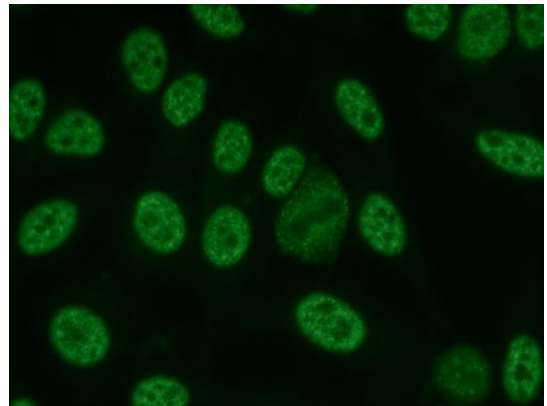
## GRUNDFÄRGNINGSMÖNSTER

---

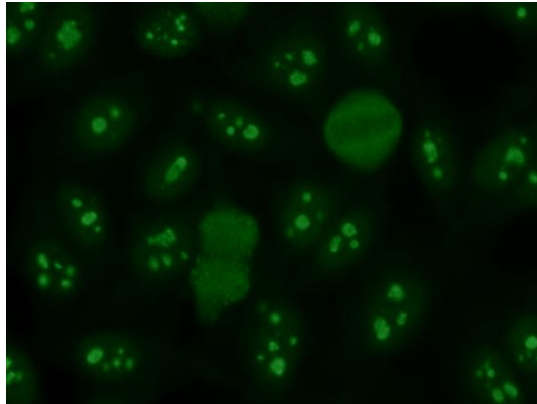
<sup>§</sup>CREST är en form av PSS med framskriden kalcinos, Raynaud-fenomen, esofageal dysfunktion, sklerodactylo och telangiectasi.



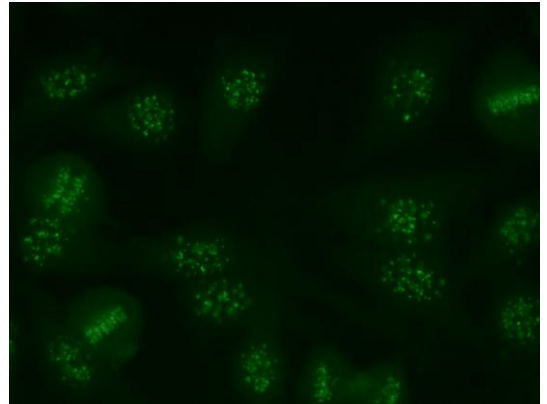
Homogent



Fläckigt



Nukleolärt



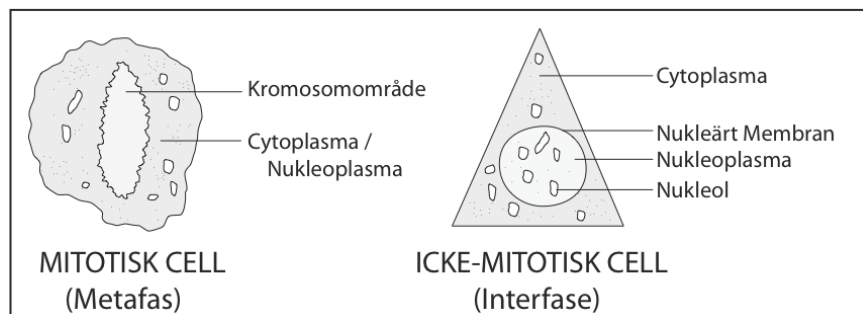
Centromert

## MITOTISKA CELLER

### DETEKTION

Mitotiska celler bör kunna synas på varje fält, när man betraktar dem i minst 200 gångers förstoring. Granska cellen i 400 gångers förstoring för att verifiera om den befinner sig i mitos. Mitotiska celler har en karaktäristisk rund form utan detekterbart nukleärt membran. Kromosomområdet i mitotiska celler har i allmänhet en oregelbunden form inuti cellen på grund av bristande nukleärmembran och extrem sammandragning av kromosomerna.

Sera som är positivt för DNA, DNP och/eller histon (exempelvis Immuno Concepts homogena positiva kontroll) uppvisar ljus färgning i sådana cellers kromosomområde. I prover som är negativa för DNA, DNP och/eller histon (exempelvis Immuno Concepts fläckiga positiva kontroll) uppvisar de mitotiska cellerna ingen kromosomfärgning, och kan därför vara svåra att upptäcka.



## ANVÄNDNING AV MITOTISKA CELLER

**Urskiljning av fläckig respektive 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 uppvisar området utanför kromosomerna en fint fläckig 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:** Antikropp som uppvisar ett perifert mönster associeras i allmänhet med DNA-/DNP-nukleära antigener. Höga antikroppnivåer för dessa antikroppar tyder på SLE. I substrat som inte inkluderar mitotiska celler kan det perifera mönstret vara svårt att urskilja från en nukleär membranantikropp. Genom att använda Immuno Concepts mitotiska celler går det att urskilja dessa mönster, eftersom de mitotiska cellernas kromosomområde färgas intensivt i ett perifert mönster, men inte färgas av en nukleär membranantikropp. Skillnaden är kliniskt betydelsefull, eftersom nukleära membranantikroppar inte har någon DNA-/DNP specificitet och inte är associerade med SLE (34).

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

## CYTOPLASMISK FLUORESCENS

Även om autoantikroppar mot cytoplasmiska antigener inte vanligtvis associeras med bindvävssjukdom, kan dessa antikroppar upptäckas genom epiteliella 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-cellsubstratet har den glatta muskelantikroppen även påvisats hos patienter med vårtor (39).

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

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

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

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

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

## TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av antinukleär antikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat tillsammans med patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och övriga diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antinukleära antikroppar. Hänsyn måste tas till kliniska symptom, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck innan eventuell behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, bland annat procainamid och hydralazin, kan medföra 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 immunofluorescens, 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 kliniker att göra ytterligare tester. Varje laboratorium bör upprätta sitt eget titerskema, baserat på antikroppar som upptäcks i patientpopulationen. Även om en högt titrerad ANA i hög grad kan tyda på bindvävssjukdom, bör detta inte betraktas som en diagnos, utan i stället ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria.
6. Färgningsmönster ändras ofta i och med fortlöpande titrering av sera. Detta beror i allmänhet på förekomsten av mer än en nukleär antikropp.
7. Eftersom många alternativ finns att tillgå när det gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras när man jämför patienternas antikroppnivåer mellan olika laboratorier.
8. Positiva ANA föreligger även hos en liten procentandel 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	Mönster-fördelning	% Positiv
Onormal population (över 4500 sera testade):		
Systemisk lupus erytematosus	S, P+H, H, P	93
Reumatoid artrit	S, H	40
Blandad bindvävssjukdom	S	99
Progressiv diffus systemisk skleros	S, N	85
Progressiv systemisk skleros-CREST	ACA	93
Reumatoid artrit hos barn		
Systemisk	S	14
Polyartikularis	S	13
Pauciartikularis-B27+	-	0
DM/PM	S	25
Vaskulit	S	20
Normal population (över 9000 sera testade):		
20-60 år	S	2
70-80 år	S	3,5

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

# PRESTANDA

Immuno Concepts ANA-testsystem utvärderades genom jämförelse med två andra fluorescerande antikroppanalyser som är kommersiellt tillgängliga (45). Studien omfattade 97 serumprover från normala individer med bland annat följande diagnoser: systemisk lupus erythematosus (SLE), blandad bindvävssjukdom (MCTD), Raynauds progressiva systemiska skleros-CREST-variant (PSS-CREST), reumatoid artrit (RA), reumatoid artrit hos barn (JRA) och andra bindvävssjukdomar. Sera testades med de screeningspådningar som rekommenderades av respektive tillverkare. Studieresultaten sammanfattas i tabell 2.

**TABELL 2**

DIAGNOS	Antal patienter	Immuno Concepts positiva 1:40	KB-cells positiva 1:20	Musnjure 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

De 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) och andra sjukdomar som inte vidare klassificerats.

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

## BIBLIOGRAFI

- 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. Immunol.* 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.
- 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.

30. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. Diagnostic Medicine. Sept. - Oct. 1979.
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 skyddsföpackningen 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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 2000-I,

4.11.02.003.089-Sv

Rev 5.2 © Copyright 2020

# FLUORESCERANDE 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. REKONSTITUTION AV BUFFERT (PBS)**  
Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-25°C i maximalt fyra veckor.
- 2. SPÄDNING AV PATIENTPROV**  
Screening: Späd patientprovet till 1:40 genom att tillsätta 0,05 ml (50 µl) serum i 1,95 ml rekonstituerad PBS.  
Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: Gör seriespädningar av screeningprover (t ex 1:80, 1:160, 1:320...etc.) med användande av PBS.
- 3. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)**  
Avlägsna objektglaset/objektglaset från påsen/påsarna och placera kontrollsera på kontrollserabrunnarna 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 fluorescensmönster som är mest likt screeningprovet (använd t ex den fläckiga positiva kontrollen för patientprover som ger ett fläckigt fluorescensmönster i screening).  
**VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.**
- 4. INKUBATIONSOBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)**  
Placera objektglaset/-n i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 5. PBS-SKÖLJNING**  
Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprutfaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.  
**OBSERVERA:** För att undvika att objektglaset korskontamineras kan du leda PBS-strålen längs objektglasets mittlinje genom att först luta objektglaset mot den övre raden av brunnar och därefter mot den nedre raden.
- 6. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**  
Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Tvättningen kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.
- 7. FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (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 objektglaset mot läskpapper eller pappershanddukar för att avlägsna överskottsvatten. Återför omedelbart objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Den fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som är kvar på objektglaset 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 FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN 15 SEKUNDER.**
- 8. INKUBATION AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)**  
Placera locket på inkubationskammaren och täck med en pappershandduk för att förhindra att det utsätts för ljus, om kammaren inte är ogenomskinlig. Odlas objektglaset/-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 9. PBS-SKÖLJNING**  
Avlägsna objektglaset/-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 10. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**  
Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Tvättningen kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas, förutsatt att motfärg inte används.  
Tillhörande motfärg: Tillsätt 5-10 droppar motfärg (0,5% Evans blå) per 100 ml PBS, innan objektglaset sänks ned. Eftersom graden av önskad motfärgning kan variera från person till person, går det att öka respektive minska dess intensitet genom att justera antalet droppar som tillsätts PBS i denna tvättning.
- 11. MONTERING AV SKYDDSREMSA**  
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten (Valfri). Knacka objektglaset mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten.  
**TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA LÄNGRE ÄN 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 objektglaset till den andra.  
**OBSERVERA:** Överflödigt monteringsmedium på objektglaset kan leda till hög bakgrundsfluorescens på grund av ljusspridning eller brist på klar upplösning av celler (otydlig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas av med läskpapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.

TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649  
eller e-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)