



HEp-2000[®] FLUORESCERANDE ANA-Ro TESTSYSTEM **För diagnostisk användning in vitro** **För yrkesmässigt bruk**

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt fluorescerande antikroppstest för den halvkvantitativa detekteringen av IgG-antinukleär antikropp (ANA) i humant serum med manuell fluorescerande mikroskopi eller med Image Navigator[®] Fluorescence Semi-Automated Microscope. Testet kan användas med manuella fluorescensmikroskop eller med det semi-automatiska fluorescensmikroskopet Image Navigator[®]. Testsystemet använder transfekterade[†] HEp-2 celler, som gör det möjligt att specifikt identifiera autoantikroppar mot SSA/Ro-antigenen. Autoantikroppar mot SSA/Ro kan uppvisa ett distinkt färgningsmönster på de transfekterade cellerna. När det finns ett sådant mönster, betraktas det som ett bekräftande bevis på att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar.

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

Detta testsystem ska användas som ett hjälpmedel vid detektion av antikroppar som är associerade med systemisk reumatisk sjukdom i samband med andra laboratorie- och kliniska fynd. En utbildad operatör måste bekräfta resultaten som genereras med den halvautomatiska enheten och programvaran Image Navigator[®].

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 är starkt förknippade 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 har ANA-testning nu etablerats 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). Detektionen av autoantikroppar mot SSA/Ro-antigen varierar i högsta grad. Gnagarvävnad innehåller inte påvisbara nivåer av SSA/Ro-antigen (25) och rapporter om detektion av anti-SSA/Ro-antikroppar i cellkultursubstrat varierar i känslighet från 50 till 90% (26-27).

Immuno Concepts HEp-2000[®] ANA-testsystem med transfekterade mitotiska* humanepiteloidceller (HEp-2) är ett avancerat immunofluorescerande system för detektion av ANA.

[†]De transfekterade cellerna och deras användning är skyddade genom USA-patent 5518881 och andra inplanerade amerikanska och utländska patent.

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

HEp-2-celler med mitotiska former har visats sig ha större känslighet och ge skarpare mönsterigenkänning än klassiskt musnjuresubstrat när det gäller detektion av antikroppar vid progressiv systemisk skleros (PSS) (28). Mitotiska former underlättar igenkännandet av olika mönster och detektion av tidigare orapporterade nukleära antigener, vilka förekommer i högre koncentrationer i mitotiskt aktiva celler (29-31). HEp-2-cellerna i det här testsystemet har transfekterats med flera kopior av den specifika DNA-sekvens som bär informationen för SSA/Ro-autoantigenen. Cirka 10-20% av de transfekterade cellerna överexpresserar den här antigenen, så att detektion av autoantikroppar mot SSA/Ro är mer jämn än för HEp-2-celler som inte har transfekterats. Autoantikroppar mot SSA/Ro kan uppvisa ett distinkt färgningsmönster på de transfekterade cellerna. När det finns ett sådant mönster betraktas det som ett bekräftande bevis på att det förekommer anti-SSA/Ro-antikroppar i provet.

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

TESTPRINCIP

Immuno Concepts fluorescerande ANA-testsystem använder den indirekta fluorescerande antikropptechnik som först beskrivits av Weller och Coons (32). 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 icke uttryckligen bundna antikroppar odlas substratet med en antihuman antikropp konjugerad med fluorescein. Om resultaten är positiva 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 studeras i fluorescerande mikroskop. I positiva prover visar cellkärnorna en äppelgrön fluorescens med ett färgningsmönster som är karaktäristiskt för den aktuella nukleära antigendistributionen i cellerna. Om provet är ANA-negativt uppvisar cellkärnan inte något sådant klart urskiljningsbart mönster av nukleär fluorescens.

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 kylförvaras i 2-10°C. Efter rekonstitution skall PBS-bufferten förvaras i skruvlockbehållare och lagras mellan 2-25°C.

Stabilitet: Samtliga komponenter förblir stabila i minst 12 månader från tillverkningsdatum, både i den slunta förpackningen och efter öppning. Använd inte någon komponent senare än dess förfallodatum.

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat [SLIDE]: ANA-objektglas för substrat med HEp-2000[®]-celler (med mitotiska former) som är odlade och stabiliserade direkt på testbrunnarna. Detta är HEp-2-celler som stabilt har transfekterats med SSA/Ro-antigenen. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspsåsen är fylld med en stabil giffri gas som bidrar till cellernas stabilitet. Skivor finns med 7 brunnar, 13 brunnar, 14 brunnar, 18 brunnar eller 21 brunnar, beroende på behoven hos laboratoriet.

SSA/Ro positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2035-Ro. Droppflaskan som är klar för användning innehåller 1,0 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikropp som är specifik för SSA/Ro-antigener. Detta serum uppvisar en finfläckig färgningsreaktion som är typisk för anti-SSA/Ro, vilket Immuno Concepts HEp-2000[®] cellsubstrat är ett exempel på. Expressionen är till övervägande grad nukleär till sin lokalisering, med framträdande nukleolär färgning. Svag cytoplasmisk färgning kan även noteras i de överexpresserande cellerna. Kromosomområdet i de mitotiska cellerna uppvisar en negativ färgreaktion.

Homogen positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2021. Droppflaskan som är klar för användning innehåller 1,0 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikropp som är specifik för DNA och/eller DNP-nukleära antigener. Detta serum visar en homogen färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. Kromosomområdet i de mitotiska cellerna uppvisar samma homogena färgreaktion.

Fläckig positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2022. Droppflaskan som är klar för användning innehåller 1,0 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikropp som är specifik för Sm och/eller RNP-nukleära antigener. Detta serum uppvisar en av de mest vanliga fläckiga färgreaktioner som noterats på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. Kromosomområdet i de mitotiska cellerna uppvisar en negativ färgreaktion.

Nukleolär positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2023. Droppflaskan som är klar för användning innehåller 1,0 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikropp som är specifik för nukleolära antigener. Detta serum uppvisar en nukleolär färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat.

Centromer positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2025. Droppflaskan som är klar för användning innehåller 1,0 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikropp som är specifik för kromosomala centromerer (kinetochore). Detta serum uppvisar en diskret fläckig färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar samma enstaka fläckiga färgningsreaktion.

Titrerbart kontrollserum [TC]: Katalognr 2026. Flaskan som är klar för användning innehåller 0,5 ml positivt humant kontrollserum med IgG-antikroppar som skall behandlas som ett outspätt patientprov.

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

Fluorescerande antikroppreagens [CONJ|FITC]: Katalognr 2009-Ro (9,0 ml), 2075-Ro (23 ml). Getantihuman IgG (tung och lätta kedjor) konjugerade med fluorescein isotiocyanat (FITC). Reagensen levereras bruksfärdiga i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser. För användare som föredrar ett fluorescerande antikropsreagens som är IgG-specifikt, katalog nr 2009CS (9,0 ml), 2009G-Ro (9,0 ml), 2009GCS-Ro (9,0 ml), 2075CS (23ml), 2075G-Ro (23ml) och 2075GCS-Ro (23ml) är tillgängliga. Kontakta din Immuno Concepts-representant för beställningsinformation.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

PBS buffertpulver [PWDR|PBS]: Katalognr 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En påse med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

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 paket innehåller tio 24 x 64 mm skyddsremсор nr 1 av glas.

YTTRELLIGARE MATERIAL SOM BEHÖVS – MEDFÖLJER EJ

Volymetriska pipetter för pipettering av 20-25 µl volymer
Coplín-kärl eller färgningsskålar
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Enlitorsbehållare (för PBS-buffert)
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att bereda serumspädningar
Petriskål eller annan kammare för inkubation
Läskpapper eller pappershanddukar
Engångshandskar
Laborietidur
Fluorescerande mikroskop utrustat med 495 nm matarfilter och 515 nm spärrfilter

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 motsägande 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 diagnostisk användning *in vitro*.
6. Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas skall inaktivt sera värmas i 30 minuter i 56°C för optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerat sera skall inte användas.
7. Det titrerbara kontrollserumet är avsett för 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 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 prov 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 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 substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom dessa förhållanden kan leda till avvikande resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

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

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprov kan ge falskt positiva eller negativa resultat.

TOLKNING AV RESULTAT

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller skall testas en gång per körning. Den positiva kontrollen bör visa ljusst äppelgrön fluorescens i cellkärnorna, med ett klart urskilningsbart mönster som är karaktäristiskt för det kontrollserum som använts. Den negativa kontrollen bör visa låg intensitet och en ospecifik matt grön fluorescens i både cytoplasman och kärnan, men utan ett urskilningsbart 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. De fem mönsterkontrollerna ska köras åtminstone en gång för varje parti av kits för att visa det förväntade utseendet på ANA-mönstren. Om HEp-2000[®] ANA-test skall användas för att bekräfta förekomsten av anti-SSA/Ro-antikroppar måste SSA/Ro positiv kontroll, katalognummer 2035-Ro, köras på minst ett objektglas under den dagens körning.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av 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 urskilningsbart nukleärt färgningsmönster är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Det medelvärde och spridningsområde för antikroppnivån (\pm en spädning på var sin sida om medelvärdet) som bestämts för detta lotnummer har fastställts i vårt laboratorium och uppges för 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) mellan olika serier.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användning av Immuno Concepts fluorescerande ANA-testsystem har ett medelantikroppvärde etablerats för varje lotnummer. Lotnumret och antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde för (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) finns angiven på flaskans etikett och skall användas som vägledning för testsystemets prestanda.

Det är viktigt att inte blanda ihop fluorescensintensiteten med förekomst respektive avsaknad av antinukleära antikroppar. Nyckelfaktorn att ta hänsyn till när man fastställer om en given serumspädning är positiv är om det finns ett klart urskiljningsbart mönster eller inte, 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 eller MND 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. 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 för 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. Detta problem kan undvikas genom att föra en tidsloggbok. För bästa resultat: Byt ut 50 watts glödlampor av kvicksilver vid 100 timmar och 100 eller 200 watts glödlampor av kvicksilver vid 200 timmar. Kvarts-/halogenljuskällor uppvisar i allmänhet ingen gradvis minskning i exciteringsenergi, 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 mikroskopljusets bana. 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 göra att ett 40X-objektiv med en NA på 0,65 läser en eller flera spädningar lägre än ett 40X-objektiv med en NA på 0,85. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet. NA påverkas inte av fluorescerande ljusmikroskopets känslighet.
6. Spärrfilter. Spärrfilter minskar de speciella 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 genomförande.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

200 gångers total förstoring rekommenderas för positiv/negativ screening och för fastställande av antikroppnivåernas ändpunkter, medan 400 gångers total förstoring rekommenderas för mönsterigenkänning och granskning av mitotiska celler.

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

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

SSA/Ro: Ett serum betraktas som positivt för SSA/Ro-antikroppar om 10-20% av interfaskärnorna uppvisar det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret som framträder som ett distinkt ljusfläckigt mönster med en betydande färgning av nukleolerna. Dessa är de överexpresserande transfekterade cellerna. Återstående 80-90% av interfaskärnorna kan, men behöver inte, uppvisa en finfläckig färgning av kärnan, med eller utan fluorescerande färgning av nukleolerna.

Antikroppnivåer: 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 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.

På grund av den ökade koncentrationen av SSA/Ro-antigen i de överexpresserande cellerna är det inte ovanligt att se en färgning av dessa celler med mycket höga antikroppnivåer. Den kliniska betydelsen av dessa höga antikroppnivåer är inte känd.

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 (33).

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 upprättat.

- 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: Cellinjen i de flesta fall nästan omöjlig att skilja från cellens centrum.

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

RESULTAT RAPPORTERING

Screening: Resultaten ska rapporteras som positiva eller negativa vid utspädningen om 1:40 och kärnfärgningsmönstret bör rapporteras för positiva prover.

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 upptäcks i patientpopulationen.

MÖNSTERDETEKTION

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

Synonymer: Diffus, fast.

Nukleära antigener: dsDNA, nDNA, DNP, histon.

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

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

Synonymer: Kantig, raggig, hinnaktig.

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

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

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

Nukleära antigener: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La och andra antigen/antikroppsystem 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 (35).

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

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

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

Centromer: Ett åtskilt fläckigt färgningsmönster som i hög grad tyder på CREST[§]-syndromvarianten av progressiv systemisk skleros (28).

De nukleära fläckarna är mycket avskiljda och vanligtvis en multipel av 46 (oftast 23-46 fläckar per kärna). Eftersom centromerer är sammandragningar där spindelfibrer binds till kromosomerna uppvisar de mitotiska cellerna samma fläckreaktion i kromosomområdet (12).

Synonymer: ACA, åtskilt fläckig.

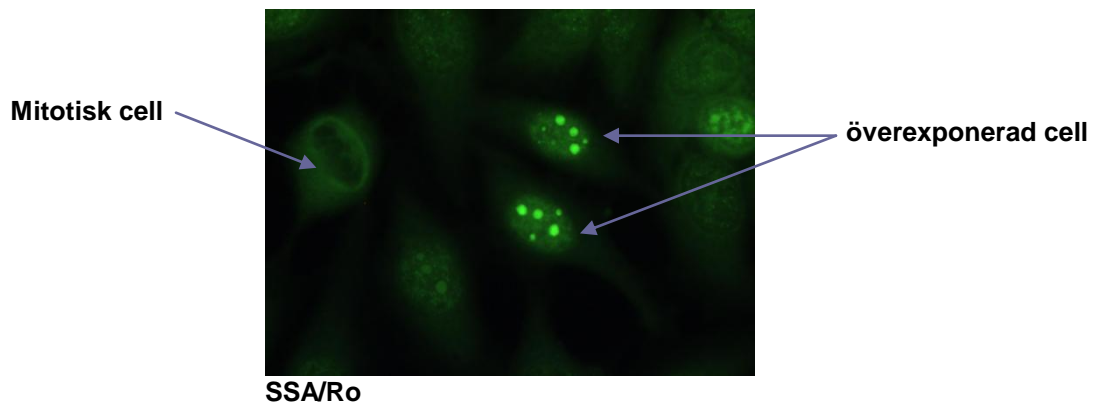
Nukleära antigener: Kromosom centromer (kinetochore).

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

SSA/Ro: Ett distinkt ljusfläckigt mönster med framträdande färgning av nukleolerna i 10-20% av interfaskärnorna. Dessa är de överexpresserande transfekterade cellerna. De återstående 80-90% av interfaskärnorna kan, men behöver inte, uppvisa en finfläckig färgning av kärnan med eller utan fluorescerande färgning av nukleolerna. De metafasmitotiska cellernas icke-kromosomområde uppvisar färgning, medan kromosomområdet är negativt.

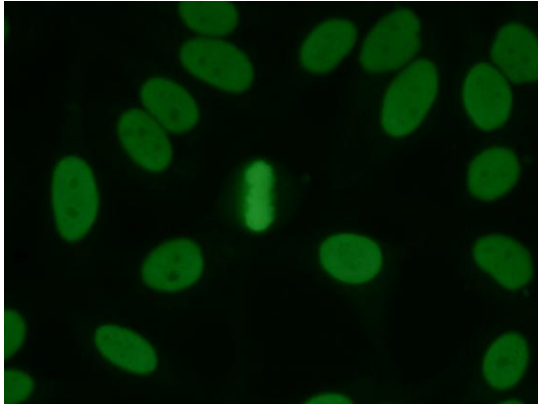
Nukleära antigener: SSA/Ro (60kD).

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

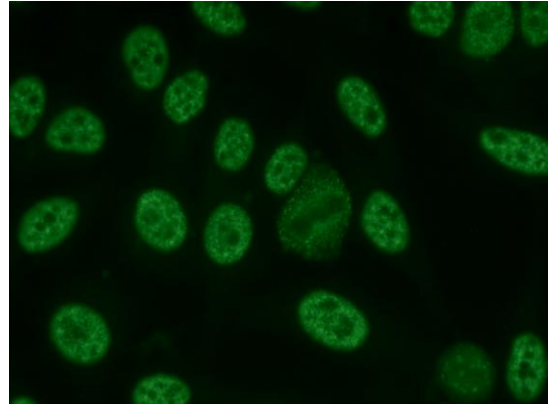


GRUNDFÄRGNINGSMÖNSTER

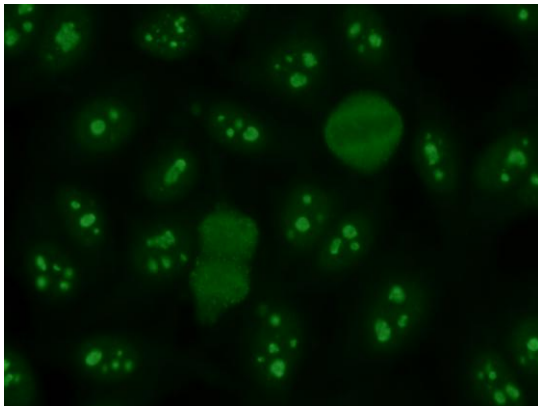
[§]CREST är en form av PSS med framskriden kalcinos, Raynaud-fenomen, esofageal dysfunktion, sklerodaktyli och telangiektasi.



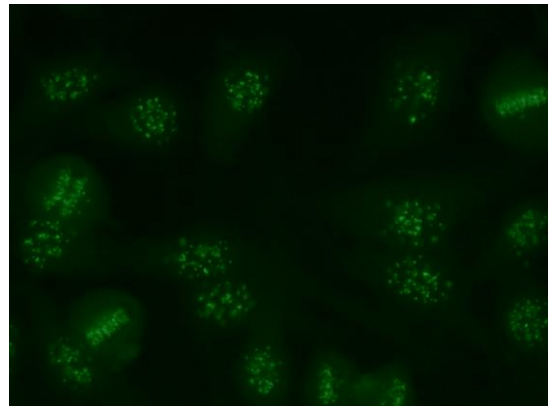
Homogent



Fläckigt



Nukleolärt



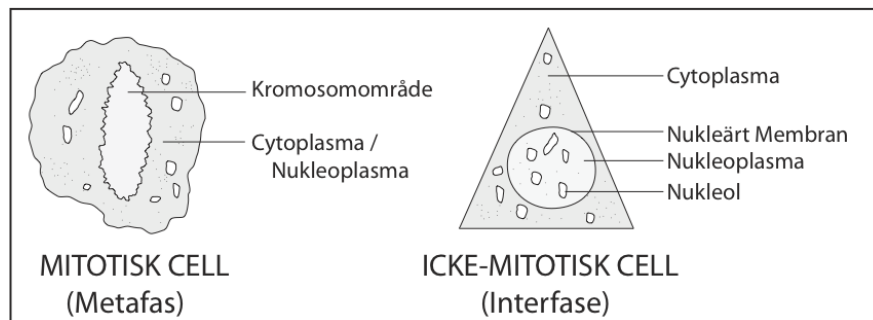
Centromert

MITOTISKA CELLER

DETEKTION

Mitotiska celler bör kunna synas i varje fält, när man granskar dem i minst 200 gångers förstoring. Granska 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 DNA-, DNP- och/eller histonpositiva (som t ex Immuno Concepts homogena positiva kontroll) uppvisar ljus färgning av dessa cellers kromosomområde. I prover som är DNA-, DNP- och/eller histon-negativa (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

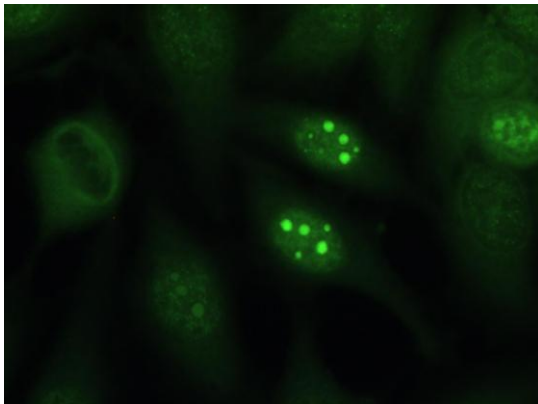
Detektion av fläckig kontra homogen antikropp: Ett finfläckigt färgningsmönster är ibland svårt att skilja från homogen färgning. Om mönstret är homogent, är de mitotiska cellernas kromosomer fast färgade. Om mönstret är strikt fläckigt, uppvisar området utanför kromosomerna en finfläckig reaktion.

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.

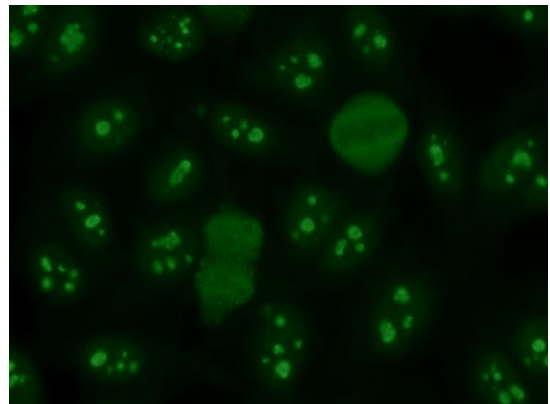
Perifer kontra nukleär membranantikropp: Antikropp som uppvisar ett perifert mönster associeras i allmänhet med DNA-/DNP-nukleära antigener. Höga nivåer av dessa antikroppar tyder på SLE. I substrat som inte innehåller mitotiska celler kan det perifera mönstret vara svårt att särskilja från nukleär membranantikropp.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

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

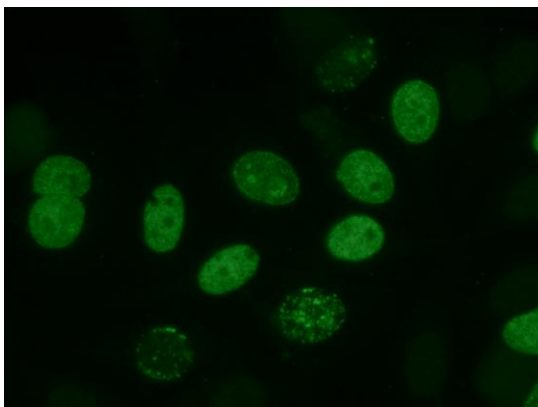
SSA/Ro kontra mönster som kan likna SSA/Ro-färgning: Den distinkta SSA/Ro-färgningen ses som ett distinkt ljusfläckigt mönster med framträdande färgning av nukleolerna i 10-20% av interfaskärnorna. De återstående 80-90% av interfaskärnorna kan, men behöver inte, uppvisa en finfläckig färgning av kärnan,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



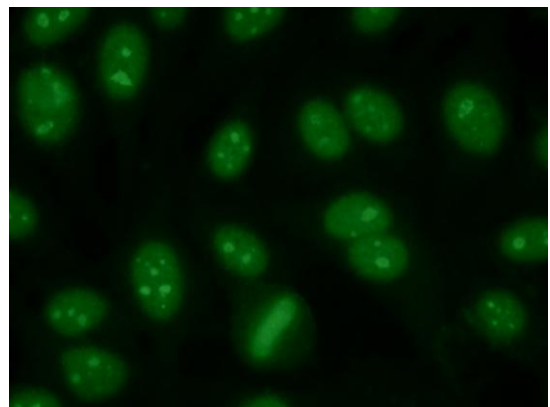
SSA/Ro



Nukleolärt



PCNA



Scl-70

CYTOPLASMISK FLUORESCENS

Även om autoantikroppar mot cytoplasmiska antigener inte normalt associeras med bindvävsjukdom, kan sådana antikroppar detekteras med epiteliala cellstruktursubstrat (40). Mitokondriala och glatta muskelantikroppar är de två

antikroppar som vanligtvis detekteras och allmänt associeras med mononukleos, kroniskt aktiv hepatit och leversjukdom (41-42). Med hjälp av HEp-2-cells substratet har den släta muskelantikroppen även påvisats hos patienter med vårtor (43).

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 (50).

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 glatt muskelantikroppens färgning likformig över hela cytoplasman och kan även sträcka sig över kärnan. Mitotiska celler uppvisar i allmänhet stora, åtskilda fläckar utanför kromosomområdet (50). Glatt muskelantikropp har visat sig ha en hög specificitet för aktin (44-45).

RAPPORTERA SERA SOM NEGATIVA FÖR ANTINUKLEÄR ANTIKROPP OCH BEKRÄFTA POSITIVT SVAR FÖR ANTI-MJUKMUSKELANTI-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 med hänsyn till patientens tidigare sjukdomar 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 behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, bland annat procainamid och hydralazin, kan medföra en sjukdom som liknar lupus erytematosus (46). Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiv homogen eller homogen/perifer ANA, som i allmänhet är riktad mot nukleära histoner (47).
4. En liten procentandel patienter med SLE uppvisar eventuellt inte ANA genom indirekt immunofluorescens, men kan ha ANA genom andra metoder (48).
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 med fortlöpande titrering av sera. Detta beror i allmänhet på förekomsten av mer än en nukleär antikropp.
7. Eftersom det finns många alternativ att tillgå när det gäller fluorescerande mikroskop, rekommenderas att ljuskällor, filter och optik standardiseras när man jämför patienters antikroppnivåer mellan olika laboratorier.
8. Positiva ANA kan även förekomma hos en liten andel patienter med smittsamma och/eller neoplastiska sjukdomar (9).
9. Autoantikroppar mot SSA/Ro uppvisar ett distinkt färgningsmönster på de transfekterade cellerna. När det finns ett sådant mönster, betraktas det som ett bekräftande bevis på att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar. Att ett sådant mönster saknas utesluter inte att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar.
10. Eftersom SSA/Ro- antigenen har en överexpression i HEp-2000[®]-cellerna, uppvisar prover som innehåller anti-SSA/Ro-antikroppar högre antikroppnivåvärden för dessa celler än de värden som erhållits på icke-transfekterade HEp-2-celler. Eftersom ingen av de andra autoantigenerna i HEp-2000[®]-cellerna påverkas av transfektionsbehandlingen, uppvisar sera med andra autoantikroppspecifiteterna inga avsevärda skillnader i antikroppnivå mellan den transfekterade HEp-2000[®]-cellinjen och icke-transfekterade HEp-2 celler.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

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

REFERENSINTERVALL

Referensintervallet för detektering av antinukleära antikroppar i den normala populationen är "Negativ". Såsom framgår av tabellen ovan kommer en liten andel av de normala individerna att uppvisa en positiv ANA. Varje laboratorium bör upprätta och upprätthålla sitt eget referensintervall (normala), baserat på patientpopulationen och andra lokala faktorer.

PRESTANDA

NORMALA PROVER

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

SERA FRÅN PATIENTER MED ENBART SSA/Ro-ANTIKROPPAR

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

SERA FRÅN PATIENTER MED ANDRA AUTOANTIKROPPAR ÄN SSA/Ro

Serumprover från 230 patienter med olika reumatiska och icke-reumatiska sjukdomar testades parallellt med hjälp av icke-transfektade HEp-2-celler tillgängliga på marknaden och HEp-2000[®] fluorescerande ANA-Ro-testsystem. Ett enda färgningsmönster noterades i 120 prover och blandade mönster noterades i 110 prover. I den totala populationen av 230 prover var 333 färgningsmönster identiska för de båda substraten. 29 prover uppvisade det distinkta „SSA/Ro“-färgningsmönstret på HEp-2000[®]-testsystem. 23 av dessa prover uppvisade fläckiga mönster på de icke-transfektade HEp-2-cellerna. De sex avvikande proverna (positiva på HEp-2000[®], men negativa på icke-transfektade HEp-2 celler) innehöll alla SSA/Ro-antikroppar, vilket det distinkta „SSA/Ro“-färgningsmönstret, ELISA-analyserna och Western blot-bekräftelsen visar.

JÄMFÖRELSE MELLAN OLIKA ANTIKROPPNIVÅER

Eftersom SSA/Ro- antigenen har en överexpression i HEp-2000[®]-cellerna, uppvisar prover som innehåller anti-SSA/Ro-antikroppar högre antikroppnivåvärden på dessa celler än de värden som erhållits på icke-transfektade HEp-2-celler.

Eftersom ingen av de andra autoantigenerna i HEp-2000[®]-cellerna påverkas av transfektionsbehandlingen, uppvisar sera med andra autoantikroppspecifiteterna inga avsevärda skillnader i antikroppnivå mellan den transfekterade HEp-2000[®]-cellinjen och icke-transfekterade HEp-2 celler.

ANTIKROPPNIVÅS REPRODUCERBARHET

Tio prover – utvalda från CDC-kontroller och andra väl karakteriserade interna sera – kördes på HEp-2000[®]-objektglas med tre olika lotnummer, vid tre olika tillfällen. Inte i något av fallen uppvisade ett negativt prov positiva resultat. Alla antikroppnivåvärden inom en dubbel spädning av det fastställda medelantikroppvärdet för samtliga prover testades.

BEKRÄFTELSE PÅ SSA/Ro-ANTIKROPPAR

I ett stort reumatologiskt referenslaboratorium analyserades serumprover från 349 patienter med bekräftade positiva ANA-tester med hjälp av HEp-2000[®] fluorescerande testsystemet. I denna utvalda population uppvisade 239 prover det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret. Positiva ELISA-tester för SSA/Ro-antikroppar erhöles i 238 (99,6%) av dessa prover. Ytterligare 79 prover uppvisade starkt fläckiga och/eller homogena mönster och gav positiva ELISA-tester för SSA/Ro-antikroppar.

Om man ser det distinkta SSA/Ro-mönstret, är detta därför en bekräftelse på att det finns SSA/Ro-antikroppar, medan avsaknad av mönstret inte utesluter att det kan finnas SSA/Ro-antikroppar. I de studier som skisserats ovan har vi undersökt totalt 429 sera innehållande SSA/Ro-antikroppar.

Dessa kan anses vara bekräftade genom ELISA-analys och/eller Western Immunoblots och de uppvisar det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret på den transfekterade HEp-2000[®] cellinjen.

Vi har även sett prover som innehåller SSA/Ro-antikroppar, men som inte uppvisar det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret, eftersom höga nivåer av andra autoantikroppar (vanligtvis anti-DNA-antikroppar eller anti-Sm/RNP-antikroppar) maskerar SSA/Ro-mönstret.

Om man ser det distinkta SSA/Ro-mönstret, är detta därför en bekräftelse på att det finns SSA/Ro-antikroppar, medan avsaknad av mönstret inte utesluter att det kan finnas SSA/Ro-antikroppar.

ANVÄND MED IMAGE NAVIGATOR[®]

Image Navigator[®] är Immuno Concepts halvautomatiserade mikroskopsystem för läsning av HEp-2000[®] fluorescerande ANA-skivor. I en jämförelse av Image Navigator[®] med konventionell avläsning av fluorescerande ANA-skivor erhöles följande data:

Positiv överensstämmelse: 99,8%, negativ överensstämmelse: 98,9%, övergripande överensstämmelse, 99,4% (n = 739 prover).

Den kliniska känsligheten för detektering av ANA hos patienter som är kända för att ha systemisk lupus erythematosus (SLE) var 93,8 % för konventionell avläsning och 94,1 % för Image Navigator[®]. Hos 301 patienter med kända bindvävssjukdomar var den kliniska känsligheten 82,7 % för konventionell läsning och 83,1 % för Image Navigator[®].

I en grupp av 296 patienter med andra sjukdomar än bindvävssjukdomar och 142 friska kontrollpersoner (total n = 438) visade sig den kliniska specificiteten vara 87,3 % för konventionell avläsning och 87,4 % för Image Navigator[®].

BIBLIOGRAFI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.

17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:785-790, 1980.
22. McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. *J. Rheum.* 7:339-347, 1980.
23. Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
24. Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am. J. Clin. Pathol.* 58:388-393, 1972.
25. Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M.: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173, 1984.
26. Maddison P.J., Provost T.T., Reichlin M.: Serological findings in patients with "ANA negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
27. Itoh Y., Rader M.D., Reichlin M.: Heterogeneity of the Ro/SS-A antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51, 1990.
28. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
29. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immuno.* 121:2228-2234, 1978.
30. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. *Arthritis Rheum.* 24:S109, 1981.
31. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzler, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
32. 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.
33. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
34. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
35. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
36. Ritchie, R.F. Antinuclear Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. *N.Engl. J. Med.* 282:1174-1178, 1970.
37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18:551-570, 1992.
38. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20. American Society of Clinical Pathologists, 1980.
39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.
41. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). *Clin. Exp. Immunol.* 39:328-336, 1980.
42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. *Ann. Int. Med.* 77:553-541, 1972.
43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. *Clin. Exp. Immunol.* 21:339-344, 1975.
44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. *Clin Exp. Immunol.* 26:57-66, 1976.
45. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 24:266-272, 1976.
46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. *Arch. Int. Med* 117:620-626, 1966.
47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560-567, 1978.
48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. *J. Rheum.* 5:142-147, 1978.
49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.
50. McCarty, G.A., Valencia, D.W., Fritzler, M. J. Antinuclear Antibodies: Contemporary Techniques and Clinical Application to Connective Tissue Diseases. New York, Oxford University Press, 1984.

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



Fabrikant



Auktoriserad Representant
europiska unionen



Temperatur
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Endast Rx - endast på ordination

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 2000-Ro-I,

4.11.02.003.091-Sv

Rev 4.3 © Copyright 2020

HEP-2000® FLUORESCERANDE ANA-RO TESTPROCEDUR

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

- 1. 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 högst fyra veckor.
- 2. SPÄDNING AV 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.
- 3. IORDNINGSTÄLLANDE AV OBJEKTGLAS FÖR SUBSTRAT (20-25 µl/brunn)**

Avlägsna objektglaset/objektglasen från påsen/påsarna och placera kontrollera 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 numrerade brunnarna.
OBSERVERA: För allmän screening rekommenderas den homogena positiva kontrollen. För halvkvantitativ titrering bör Titratable Control, katalognummer 2026, köras med varje sats patientprover. Alla mönsterkontroller ska köras med varje partinummer av kits för att visa det förväntade utseendet på ANA-mönstren. Om HEP-2000® ANA-test skall användas för att bekräfta förekomsten av anti-SSA/Ro-antikroppar, måste SSA/Ro positiv kontroll, katalognummer 2035-Ro, köras på minst ett objektglas under den dagens körning.
VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.
- 4. ODLING AV OBJEKTGLAS (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 sprutflaska, Pasteur eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 6. PBS-TVÄTTNING (tio minuter)**

Tvätta objektglaset/-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.
- 7. FLUORESCERANDE ANTIKROPPREAGENS (täckt 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 läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför genast objektglaset till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med en fluorescerande antikroppreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Fluorescerande antikroppreagens har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som finns 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 FEMTON SEKUNDER.
- 8. ODLING 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. Den här tvättningen kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas, om inte motfärg 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 objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten.
TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA LÄNGRE ÄN 15 SEKUNDER. Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luffickor 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 cellerna (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglaset genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan.
- 12. LÄS AV SKIVA**

Om bilden ska läsas av med hjälp av konventionell fluorescerande mikroskopi, kan den läsas av omedelbart med hjälp av laboratoriets standardprocedur. Skivorna måste alltid läsas av av en utbildad användare som är bekant med fluorescerande ANA-tolkning och mönster. Kontakta leverantören för det fluorescerande mikroskopet för instruktioner för användning av mikroskopet.

Om skivan som ska läsas med hjälp av Image Navigator®, Immuno Concepts automatiska mikroskopi och bildtagningssystem så ska du läsa användarhandboken för Image Navigator®-systemet. Image Navigator® får endast användas av en utbildad användare.
TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649
eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

* Laboratorier som vill genomföra screening vid en annan utspädning än den rekommenderade utspädningen måste validera användningen av den alternativa screeningsutspädningen för deras patientpopulation.