



HEp-2000[®] IgG ANA-Ro FLUORESZENZ-TESTSYSTEM

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

INDIKATION: Dies ist ein indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für den semiquantitativen Nachweis von antinukleären IgG-Antikörpern (ANA) in humanem Serum durch manuelle Fluoreszenzmikroskopie oder mit dem halbautomatischen Fluoreszenzmikroskop Image Navigator[®]. Das Testsystem arbeitet mit transfizierten[†] HEp-2 Zellen, welche die spezifische Identifikation von Autoantikörpern gegen SSA/Ro Antigen ermöglichen. Autoantikörper gegen SSA/Ro weisen auf den transfizierten Zellen u.U. ein spezielles Verfärbungsmuster auf. Ist dieses Muster vorhanden, so ist dies als Bestätigung für das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern zu werten.

Andererseits ist durch das Fehlen eines solchen speziellen Musters das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern nicht auszuschließen.

Dieses Testsystem unterstützt den Antikörpernachweis bei systemischen rheumatischen Erkrankungen in Verbindung mit anderen Labor- und klinischen Befunden. Die mit dem halbautomatischen Image Navigator[®] und der Software generierten Ergebnisse müssen von einem geschulten Bediener bestätigt werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

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

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

Die Sensitivität des ANA Tests hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Art des verwendeten Substrats, Fixierungsverfahren und den im Serum vorhandenen ANA-Typen. Zellkultursubstrate weisen im Allgemeinen eine höhere Sensitivität als Gewebeteile auf (21-24). Der Nachweis von Autoantikörpern gegen das SSA/Ro Antigen vollzieht sich sehr unterschiedlich. Nagetiergewebe enthält keine nachweisbaren Mengen von SSA/Ro Antigen (25); über unterschiedliche Sensitivität von 50 bis 90% beim Nachweis von anti-SSA/Ro Antikörpern in Zellkultursubstraten wurde berichtet (26-27).

[†]Die transfizierten Zellen und deren Verwendung sind durch US-Patent 5,518,881.

Das Immuno Concepts HEp-2000® ANA Testsystem mit transfizierten mitotischen* Human-epitheloiden Zellen (HEp-2) stellt ein fortgeschrittenes Immunofluoreszenz-System zum Nachweis von ANA dar.

Es hat sich gezeigt, dass HEp-2 Zellen mit mitotischer Ausprägung eine höhere Sensitivität aufweisen und eine bessere Mustererkennung als die klassischen Nierensubstrate von Mäusen beim Nachweis von Antikörpern in progressiver systemischer Sklerose (PSS) bieten (28). Die mitotische Ausprägung hilft bei der Differenzierung der Mustererkennung sowie beim Nachweis von zuvor unbekanntem nukleären Antigenen, die in mitotisch aktiven Zellen in höheren Konzentrationen vorhanden sind (29-31). Die HEp-2 Zellen in diesem Testsystem wurden mit mehreren Kopien der spezifischen DNA-Sequenz transfiziert, welche die Informationen für das SSA/Ro Autoantigen trägt. Etwa 10-20% der transfizierten Zellen reagieren auf dieses Antigen überdeutlich, so dass der Nachweis der Autoantikörper gegen SSA/Ro eine höhere Konsistenz als auf nicht transfizierten HEp-2 Zellen aufweist. Autoantikörper gegen SSA/Ro weisen auf den transfizierten Zellen u.U. ein spezielles Verfärbungsmuster auf. Ist dieses Muster vorhanden, so ist dies als Bestätigung für das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern zu werten.

Andererseits ist durch das Fehlen eines solchen speziellen Musters das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern nicht auszuschließen.

TESTPRINZIP

Das Immuno Concepts Fluoreszenz-ANA Testsystem arbeitet mit der Methode der indirekten Fluoreszenz-Antikörper, wie sie von Weller und Coons zuerst beschrieben wurde (32). Dabei werden Patientenproben mit Antigensubstrat inkubiert, um spezifische Bindungen von Autoantikörpern an Zellkerne zu ermöglichen. Wenn ANA vorhanden sind, bildet sich ein stabiler Antigen-Antikörperkomplex. Nach dem Waschen, bei dem nicht-spezifisch gebundene Antikörper entfernt werden, wird das Substrat mit einem anti-humanen Antikörperreagens, das an Fluoreszein konjugiert ist, inkubiert. Bei positivem Ergebnis bildet sich ein stabiler dreiteiliger Komplex, bestehend aus an human-antinukleäre Antikörper gebundenen Fluoreszenz-Antikörpern, welche ihrerseits an Zellkern-Antigen gebunden sind. Dieser Komplex kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops sichtbar gemacht werden. In positiven Proben weisen die Zellkerne eine apfelgrüne Fluoreszenz mit einer für diese Zellkern-Antigenverteilung charakteristischen Färbung innerhalb der Zellen auf. Wenn die Probe für ANA negativ ist, zeigt der Zellkern keine deutliche Fluoreszenz.

SYSTEMKOMPONENTEN – IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Verwendung: Sämtliche Komponenten werden gebrauchsfertig geliefert, ohne dass Aliquotieren oder eine Rekonstitution erforderlich sind (mit Ausnahme des PBS-Puffers, der vor Gebrauch in deionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden muss).

Aufbewahrung: Alle Komponenten können gekühlt bei 2-10°C aufbewahrt werden. Nach Rekonstitution sollte PBS-Puffer in Behälter mit Schraubverschluss gespeichert und zwischen 2-25°C gelagert werden.

Stabilität: Alle Komponenten bleiben sowohl im geschlossenen Kit als auch nach dem Öffnen mindestens 12 Monate ab Herstellungsdatum stabil. Komponenten nicht mehr verwenden, wenn das Verfalldatum überschritten ist.

REAKTIVE REAGENZIEN

Substratträger SLIDE: Objektträger mit HEp-2000® Zellen (mit mitotischer Ausprägung) für ANA-Substrat direkt in den Testvertiefungen kultiviert und stabilisiert. Es handelt sich dabei um HEp-2 Zellen, die stabil mit dem SSA/Ro Autoantigen transfiziert wurden. Durch eine spezielle Konstruktion wird die Gefahr der Kreuzkontamination der Vertiefungen bei den Tests minimiert. Der Objektträgerbeutel ist mit einem inaktiven nicht-toxischen Gas gefüllt, das zur Stabilität der Zellen beiträgt. Je nach Laborbedarf sind Objektträger mit 7 Vertiefungen, 13 Vertiefungen, 14 Vertiefungen, 18 Vertiefungen oder 21 Vertiefungen erhältlich.

SSA/Ro Positivkontrolle CONTROL +: Katalognummer 2035-Ro. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positivem Humankontrollserum und IgG- Antikörpern, die spezifisch für SSA/Ro-Antigene sind. Dieses Serum weist eine für anti-SSA/Ro typische fleckige Verfärbung auf HEp-2000® Zell-Substrat von Immuno Concepts auf. Die Ausprägung ist, auf den Standort bezogen, vorherrschend nukleär, mit deutlichen nukleolaren Verfärbungen. In Zellen mit Überreaktion ist u.U. auch eine schwache Verfärbung des Zytoplasma festzustellen. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt eine negative Färbung.

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

Homogenes Positivkontrollserum [CONTROL|+]: Katalognummer 2021. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positivem Humankontrollserum und IgG- Antikörpern, die spezifisch für nukleäre DNA- und/oder DNP-Antigene sind. Dieses Serum zeigt eine homogene Färbung auf HEp-2000® Zell-Substraten von Immuno Concepts. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt dieselbe homogene Färbung.

Gefleckte Positivkontrolle [CONTROL|+]: Katalognummer 2022. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positivem Humankontrollserum und IgG- Antikörpern, die spezifisch für nukleäre Sm- und/oder RNP-Antigene sind. Dieses Serum weist eine häufig anzutreffende fleckige Verfärbung auf HEp-2000® Zell-Substrat von Immuno Concepts auf. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt eine negative Färbung.

Nukleolus-Positivkontrolle [CONTROL|+]: Katalognummer 2023. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positivem Humankontrollserum und IgG- Antikörpern, die spezifisch für nukleoläre Antigene sind. Dieses Serum zeigt eine nukleolare Färbung auf HEp-2000® Zell-Substraten von Immuno Concepts.

Zentromer-Positivkontrolle [CONTROL|+]: Katalognummer 2025. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positivem Humankontrollserum und IgG- Antikörpern, die spezifisch für Chromosomencentromere (Kinetochor) sind. Dieses Serum zeigt eine diskrete fleckige Verfärbung auf HEp-2000® Zell-Substraten von Immuno Concepts. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt dieselbe diskrete Fleckenbildung und Färbung.

Titrierbares Kontrollserum [TC]: Katalognummer 2026. Gebrauchsfertiges Fläschchen mit 0,5 ml positivem Humankontrollserum und IgG-Antikörpern, die als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln sind.

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

Fluoreszenz-Antikörperreagens [CONJ|FITC]: Katalognummer 2009CS (9,0 ml), 2009G-Ro (9,0 ml), 2009GCS-Ro (9,0 ml), 2075CS (23 ml), 2075G-Ro (23 ml), 2075GCS-Ro (23 ml). Anti-human-IgG, (Gammaketten-spezifisch) an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens in Präzisions-Tropffläschchen mit 9,0 ml für alle 10 Objektträger im Lieferumfang des Testkits.

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

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

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

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

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

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN – NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 20-25 µl
Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen
Spritflasche oder Pasteur-Pipetten
Serologische Pipetten
Mehrere 1-Liter-Behälter (für PBS-Waschpuffer)
Deionisiertes oder destilliertes Wasser
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen
Petrischale oder anderer Behälter zur Inkubation
Saugpapier oder Papierhandtücher
Einmalhandschuhe
Laborstopuhr
Fluoreszenz-Mikroskop mit 495 nm Erregerfilter und 515 nm Sperrfilter

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche für dieses Produkt verwendeten Materialien menschlichen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet.
Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kitbestandteile wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control / National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Falls hämolysierte oder lipämische Seren verwendet werden müssen, die Seren durch Hitzeeinwirkung (30 Minuten bei 56°C) inaktivieren, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Mikrobiell kontaminierte Seren dürfen nicht verwendet werden.
7. Das titrierbare Kontrollserum ist für die Überwachung der Chargen- und Testlauf-übergreifenden Reproduzierbarkeit bestimmt. Es ist nicht zur Messung der Gesamtsensibilität oder Spezifität des Tests bestimmt.
8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Objektträger und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
16. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.

PROBENGEWINNUNG

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

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

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

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

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

QUALITÄTSSICHERUNG

Positiv-, Negativ- und PBS-Kontrollen müssen in jeweils einzelnen Durchläufen erfolgen. Die positive Kontrollvertiefung sollte eine helle apfelgrüne Fluoreszenz im Zellkern aufweisen, mit einer deutlichen Verfärbung wie sie für das verwendete Kontrollserum typisch ist. Die Negativkontrolle sollte eine wenig intensive, nicht-spezifische mattgrüne Fluoreszenz in Zytoplasma und Nukleus aufweisen, jedoch ohne deutliches Muster einer Verfärbung des Zellkerns. Die

PBS-Kontrollvertiefung wird zur Beobachtung nicht-spezifischer Verfärbungen durch das Antikörper-Reagens verwendet und sollte keine grüne Fluoreszenz aufweisen. Wenn die Kontrollvertiefungen nicht die beschriebenen Merkmale aufweisen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Die fünf Musterkontrollen sollten mindestens einmal für jede Charge von Kits durchgeführt werden, um das erwartete Erscheinungsbild der ANA-Muster zu demonstrieren. Falls der HEp-2000[®] ANA Test zur Bestätigung des Vorhandenseins von anti-SSA/Ro Antikörpern dient, muss die SSA/Ro Positivkontrolle, Katalognummer 2035-Ro, auf mindestens einem Objektträger am selben Tag mitlaufen.

OPTIONALE TITRIERBARE KONTROLLE

Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:40-Verdünnung fort.

Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Zellkerns sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

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

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

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

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

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

1. Die Art der verwendeten Lichtquelle. Quecksilber-Lichtquellen produzieren bei 495 nm mehr Erregerenergie als Quarz/Halogen. Quecksilber-Lichtquellen mit 50 Watt, 100 Watt und 200 Watt weisen bei 495 nm nur geringe Unterschiede in der Erregerenergie auf. Quarz/Halogen-Lichtquellen mit 100 Watt erzeugen bei 495 nm mehr Erregerenergie als solche mit 50 Watt.
2. Zustand und Alter der Lichtquelle. Dies gilt besonders für Quecksilber-Lichtquellen, bei denen in der Regel vor dem Durchbrennen eine allmähliche Reduzierung der Erregerenergie bei 495 nm zu beobachten ist. Dieser allmähliche Rückgang der Erregerenergie kann im Verlauf mehrerer Wochen zu einem deutlichen Sensibilitätsverlust führen. Das Problem kann durch Führen eines Lampenprotokolls vermieden werden. Für beste Ergebnisse empfiehlt es sich, 50 Watt-Quecksilberbirnen nach 100 Stunden und 100 oder 200 Watt-Quecksilberbirnen nach 200 Stunden auszuwechseln. Bei Quarz/Halogen-Lichtquellen tritt in der Regel vor dem Durchbrennen keine allmähliche Reduzierung der Erregerenergie auf.
3. Die Art des verwendeten Erregerfilters. Interferenz-Erregerfilter bieten höhere Sensibilität über eine viel schmalere Wellenlänge als Absorptions-Erregerfilter. Ziehen Sie für weitere Informationen die Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop zu Rate oder wenden Sie sich an den Verkäufer.
4. Korrekte Ausrichtung des Lichtwegs im Mikroskop. Dazu die Anweisungen in der Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop lesen.
5. Die Blendenöffnung des Objektivs. Bei Epi (Auflicht-Fluoreszenz) kann die Fluoreszenz exponential erhöht werden, da die Blendenöffnung des Objektivs additiv vergrößert wird. Auf diese Weise kann ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung mit einer Blendenöffnung von 0,65 unter Umständen ein bis zwei Verdünnungen tiefer gehen als das gleiche Objektiv mit einer Blendenöffnung von 0,85. Die Blendenöffnung ist seitlich am Objektiv aufgedruckt. Die Blendenöffnung hat keine Auswirkung auf die Sensitivität der übertragenen Fluoreszenz-Licht-Mikroskopie.
6. Unterdrückungsfiler. Mit Unterdrückungsfilern können spezifische Erreger-Wellenlängen reduziert und zur Reduzierung der Sensibilität verwendet werden. Ziehen Sie für weitere Informationen die Gebrauchsanweisung zu Ihrem Fluoreszenz-Mikroskop zu Rate oder wenden Sie sich an den Verkäufer.
7. Präzision und Genauigkeit der Verdünnungstechnik, der Ausrüstung und der Ausführung der Testverfahren.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

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

Negative Reaktion: Ein Serum ist als negativ für antinukleäre Antikörper zu werten, wenn die Verfärbung des Nukleus geringer als oder gleich der negativen Kontrollvertiefung und kein deutliches Muster zu erkennen ist.

Das Zytoplasma kann eine schwache Verfärbung aufweisen, wobei der außerhalb des Chromosomen liegende Bereich mitotischer Zellen eine hellere Verfärbung zeigt und kein deutliches Muster im Nukleus zu erkennen ist.

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

SSA/Ro: Ein Serum ist als positiv für SSA/Ro Antikörper zu werten, wenn 10-20% der Interphasen-Nuclei das charakteristische SSA/Ro Verfärbungsmuster aufweisen, ein hell geflecktes Muster mit deutlicher Verfärbung der Nucleoli. Dabei handelt es sich um transfizierte Zellen mit Überreaktion. Die übrigen 80-90% der Interphasen-Nuclei weisen manchmal eine fein gefleckte Verfärbung des Nukleus auf, mit oder ohne Fluoreszenzfärbung der Nucleoli.

Titrierungen: Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:40-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts. Es ist wichtig, die Intensität der Verfärbung nicht mit dem Vorhandensein bzw. Fehlen von antinukleären Antikörpern zu verwechseln. Der entscheidende Faktor, ob die Bestimmung einer gegebenen Serumverdünnung als positiv zu werten ist, ist das Vorhandensein eines deutlich erkennbaren Musters, unabhängig von der Intensität der Verfärbung. Aufgrund der erhöhten Konzentration von SSA/Ro Antigenen in den Zellen mit Überreaktion ist es nicht ungewöhnlich, wenn bei sehr hohen Titrierungen eine Verfärbung der Zellen auftritt. Die klinische Bedeutung dieser hohen Titrierungen ist nicht bekannt.

ACHTUNG: Einige Seren können eine Verfärbung des Nukleus und des Zytoplasma ohne deutliches Muster aufweisen. Dieses Phänomen ist im Allgemeinen auf heterophile Antikörper zurückzuführen und ist als negativ zu werten (33).

FLUORESCENZ-INTENSITÄT

Die Fluoreszenz-Intensität kann semiquantisiert werden, wenn die Richtlinien zu Fluoreszenz-Antikörperreagenzien, wie sie von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC) aufgestellt wurden, befolgt werden.

- 4+ Brilliant gelb-grün (maximale Fluoreszenz): deutliche Zellkontur; scharf definierter Zellmittelpunkt.
- 3+ Weniger brillante gelb-grüne Fluoreszenz: deutliche Zellkontur; scharf definierter Zellmittelpunkt.
- 2+ Klare Zellstruktur, jedoch schwache Fluoreszenz: Zellkontur weniger klar definiert.
- 1+ Äußerst schwache Fluoreszenz: Zellkontur ist in den meisten Fällen kaum vom Zellmittelpunkt zu unterscheiden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität ist ein Standard-Objektträger, FITC QC Slide™, Katalognummer 1900, von Immuno Concepts, N.A., Ltd. erhältlich.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Screening: Die Ergebnisse des Tests sind bei der Verdünnung 1:40 als positiv oder negativ anzugeben, und das nukleäre Färbungsmuster ist für positive Proben anzugeben.

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

MUSTERERKENNUNG

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

Synonyme Bezeichnung: Diffus; fest.

Nukleäre Antigene: dsDNA; nDNA; DNP; Histon.

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE schließen. Niedrige Titrierungen lassen auf SLE oder andere Bindegewebskrankheiten schließen (34).

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

Synonyme Bezeichnung: Rand, zottelig, membranös.

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

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE schließen; niedrigere Titrierungen lassen auf SLE oder andere Bindegewebskrankheiten schließen (34).

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

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

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE (Sm Antigen), gemischte Bindegewebskrankheit (RNP Antigen), Sklerodermie (Scl-70 Antigen) oder Sjögren-Syndrom-Sicca-Komplex (SSA/Ro oder SSB/La Antigen) schließen. Niedrigere Titrierungen lassen auf andere Bindegewebskrankheiten schließen (35).

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

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

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen, vor allem bei Sklerodermie und Sjögren-Syndrom (36).

Zentromer: Eine diskrete fleckige Verfärbung, die stark auf das CREST[§] Syndrom schließen lässt, eine Variante der progressiven systemischen Sklerose (28). Die Flecken im Nukleus sind sehr diskret und in der Regel ein Vielfaches von 46 (meist 23-46 Flecken pro Nukleus). Da es sich bei Zentromeren um Bündelungen handelt, wobei Spindelfasern an den Chromosomen anhaften, weisen mitotische Zellen im Chromosombereich dieselbe Fleckenbildung auf (12).

Synonyme Bezeichnung: ACA; diskrete Fleckenbildung.

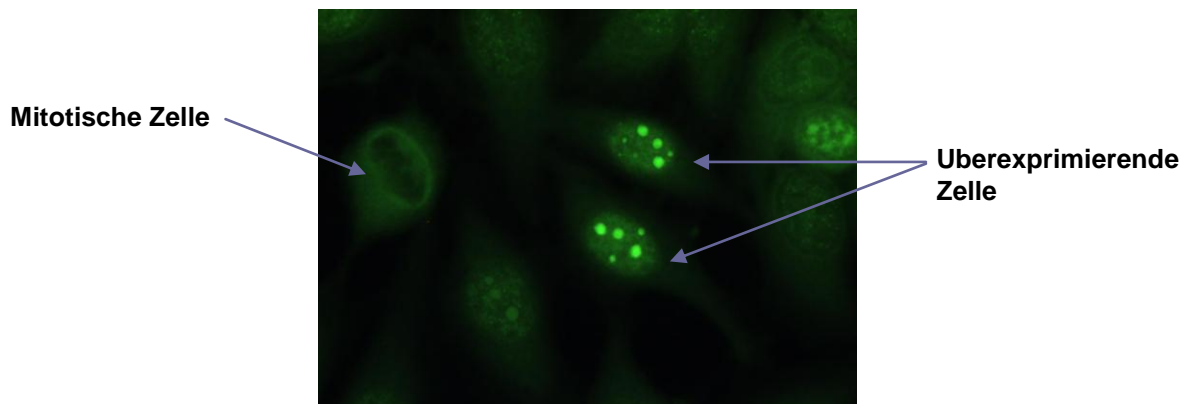
Nukleäre Antigene: Chromosomen-Zentromer (Kinetochor).

Assoziierte Erkrankung: Deutliches Indiz für CREST Syndrom, eine Variante der progressiven systemischen Sklerose (28)

SSA/Ro: Ein charakteristisches helles Fleckenmuster mit deutlicher Verfärbung der Nucleoli in 10-20% der Interphasen-Nuclei. Dabei handelt es sich um transfixierte Zellen mit Überreaktion. Die übrigen 80-90% der Interphasen-Nuclei weisen manchmal eine fein gefleckte Verfärbung des Nukleus auf, mit oder ohne Fluoreszenzfärbung der Nucleoli. Der Bereich außerhalb des Chromosoms mitotischer Metaphasezellen zeigt eine Verfärbung, der Chromosombereich ist jedoch negativ.

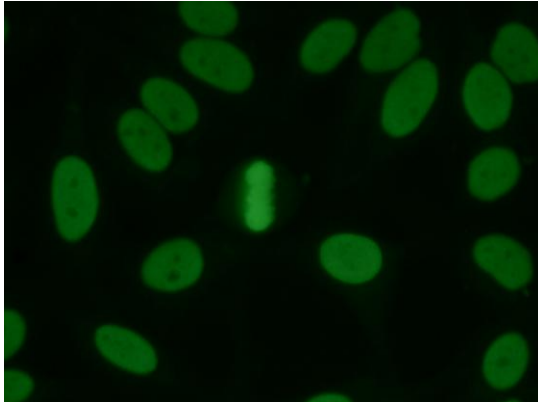
Nukleäre Antigene: SSA/Ro (60kD).

Assoziierte Erkrankung: Festzustellen bei 60-70% der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, 30-40% der Patienten mit SLE und mehr als 95% der Patienten mit subakutem kutanem Lupus (37).

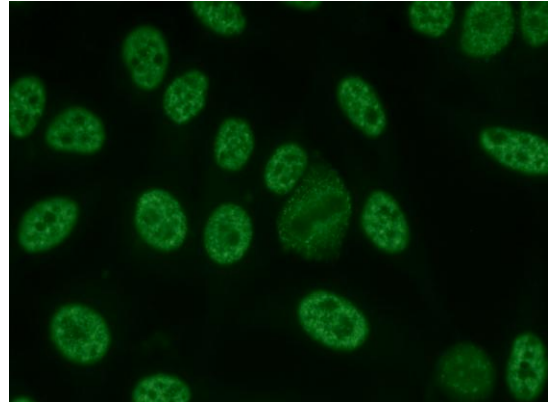


[§]CREST ist eine Form von PSS, mit hervorragender Kalzinose, Raynaud'sches Phänomen, Ösophagus-Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasie.

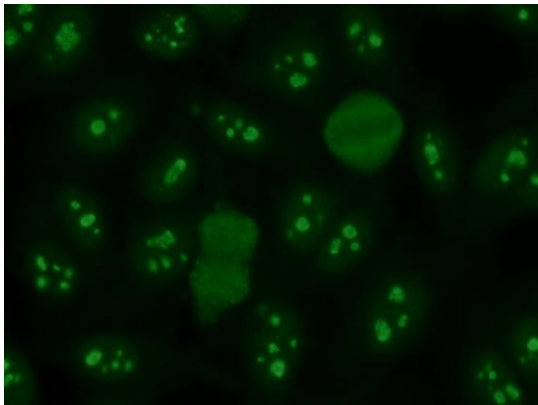
GRUNDLEGENDE VERFÄRBUNG MUSTER



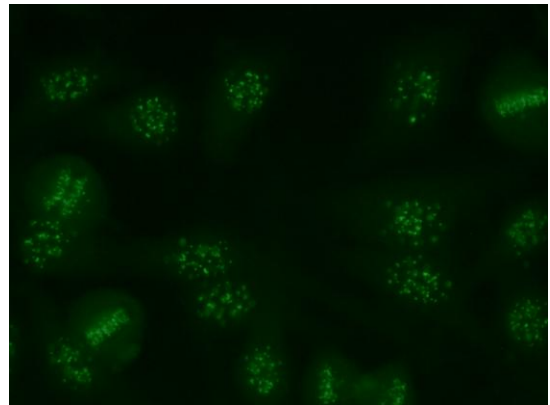
Homogene



Gesprenkelte



Nukleoläre



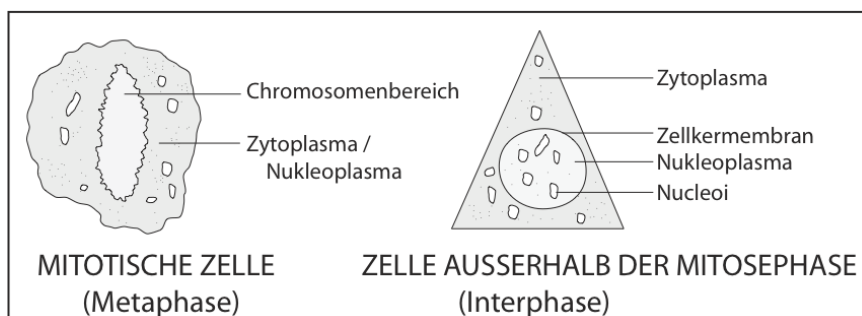
Zentromer

MITOTISCHE ZELLEN

NACHWEIS

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

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



VERWENDUNG MITOTISCHER ZELLEN

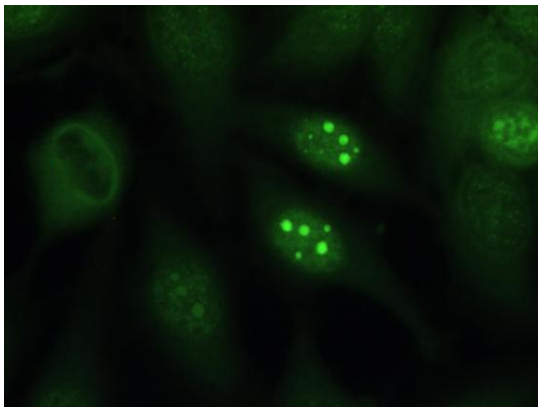
Unterscheidung von gefleckten vs. homogenen Antikörpern: Feine Fleckenstrukturen sind u.U. schwer von homogenen Verfärbungen zu unterscheiden. Kennzeichen einer homogenen Struktur ist eine durchgehende Verfärbung der Chromosomen mitotischer Zellen. Zeigt das Muster deutliche Fleckenbildung, dann weist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

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

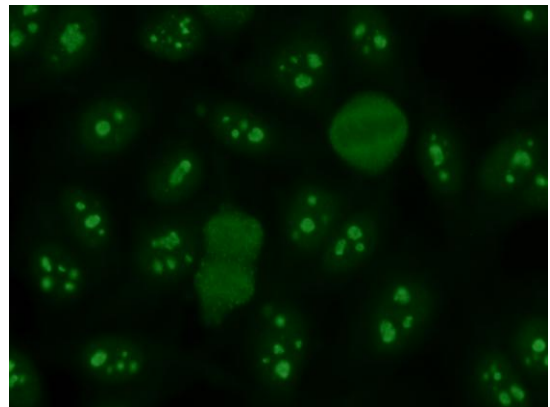
Periphere vs. Kernmembran-Antikörper: Antikörper, die ein peripheres Muster aufweisen, werden im Allgemeinen mit DNA/DNP nukleären Antigenen assoziiert. Hohe Titrierungen dieser Antikörper lassen auf SLE schließen. In Substraten, die keine mitotischen Zellen enthalten, ist das periphere Muster u.U. schwer von Kernmembran-Antikörpern zu unterscheiden. Wenn die mitotischen Zellen von Immuno Concepts verwendet werden, sind diese Muster zu unterscheiden, da der Chromosombereich der mitotischen Zellen eine intensive periphere Verfärbung aufweist, es tritt jedoch keine Verfärbung durch Zellkernmembran-Antikörper ein. Diese Unterscheidung ist klinisch sehr wichtig, da Zellkernmembran-Antikörper keine DNA-/DNP-Spezifität aufweisen und nicht mit SLE assoziiert werden (38).

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

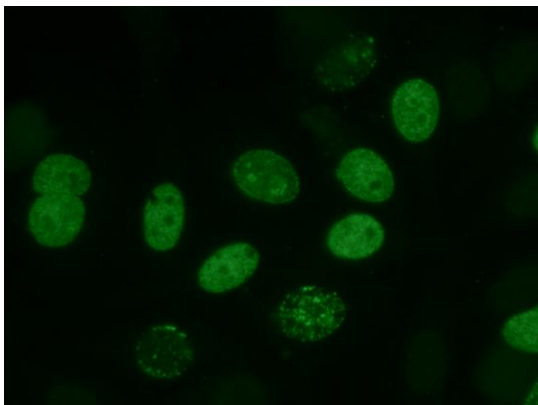
SSA/Ro vs. Muster, die einer SSA/Ro Verfärbung ähneln: Die charakteristische SSA/Ro-Färbung ist als deutliches helles Fleckenmuster mit starker Verfärbung der Nucleoli in 10-20% der Interphasen-Nuclei zu sehen. Die übrigen 80-90% der Interphasen-Nuclei weisen manchmal eine fein gefleckte Verfärbung des Nucleus auf, mit oder ohne Fluoreszenzfärbung der Nucleoli. Der Chromosombereich mitotischer Metaphasezellen zeigt keine Verfärbung. Das nukleolare Muster kann durch eine große grobfleckige Verfärbung aller Nuclei, meist weniger als 6 pro Zelle, identifiziert werden. Das Scl-70 Muster weist eine feine fleckige Verfärbung und eine nukleolare Verfärbung aller Interphasen-Nuclei auf und eine Verfärbung im Chromosombereich mitotischer Metaphasezellen. Antikörper gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) weisen unterschiedliche grobe und feine Flecken in 30-50% der Interphasen-Nuclei auf.



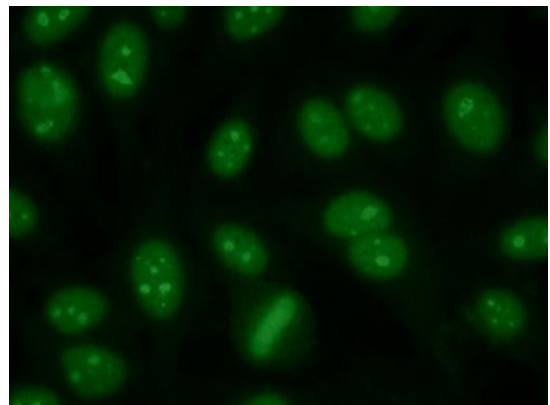
SSA/Ro



Nukleoläre



PCNA



Scl-70

ZYTOPLASMA-FLUORESZENZ

Auch wenn Autoantikörper gegen Zytoplasma-Antigene im Allgemeinen nicht mit Bindegewebskrankheit assoziiert werden, können diese Antikörper mithilfe von Epithel-Zellkultursubstraten nachgewiesen werden (40). Mitochondrien- und gleichmäßige Muskel-Antikörper sind die beiden am häufigsten nachgewiesenen Antikörper und werden im Allgemeinen mit Mononukleose, chronischer aktiver Hepatitis und Lebererkrankung assoziiert (41-42). Mithilfe des HEp-2 Zellsubstrats konnten gleichmäßige Muskel-Antikörper auch in Patienten mit Warzen nachgewiesen werden (43).

Anti-Mitochondrien-Antikörper (AMA): Diskrete Flecken, im perinukleären Bereich der Zelle konzentriert sowie in niedrigerer Dichte auf die Außenbereiche des Zytoplasma verteilt. Diese sind von Anti-Golgi Antikörpern zu unterscheiden, welche im Allgemeinen nur auf einer Seite des perinukleären Bereichs Flecken bilden, sowie von Anti-Ribosomen-Antikörpern, welche feinere Flecken mit einem strangartigen Erscheinungsbild aufweisen, das mit dem Standort des endoplasmischen Retikulums innerhalb der Zelle konsistent ist (50).

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

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

Anti-gleichmäßige Muskel-Antikörper (ASMA): Sehr feine fibröse Verfärbungen der Zellen über das ganze Zytoplasma mit „Spinnweb“-ähnlichem Aussehen. Im Gegensatz zu Mitochondrien-Antikörpern, sind Verfärbungen von gleichmäßigen Muskel-Antikörpern gleichmäßig über das ganze Zytoplasma verteilt und können sich über den Nukleus hinaus ausdehnen. Mitotische Zellen weisen im Allgemeinen große diskrete Flecken außerhalb des Chromosombereichs auf (50). Gleichmäßige Muskel-Antikörper haben erwiesenermaßen eine hohe Spezifität mit Aktin (44-45).

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

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises antinukleärer Antikörper eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für antinukleäre Antikörper mit diesem Test sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Medikamente, darunter Procainamid und Hydralazin, können eine Lupus erythematosus-ähnliche Erkrankung induzieren (46). Patienten mit medikamenteninduziertem LE können u.U. positiv homogene oder homogen/periphere ANA aufweisen, die direkt gegen nukleäre Histone gerichtet sind (47).
4. Bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten mit SLE sind durch Immunofluoreszenz u.U. keine ANA nachweisbar, sie können jedoch mithilfe anderer Techniken nachgewiesen werden (48).
5. Es ist nicht erforderlich, den Titerendpunkt zu bestimmen. Jeder ANA-Titer größer oder gleich 1: 640 gilt als hoher Titer und weist den Kliniker auf die Notwendigkeit zusätzlicher Tests hin. Jedes Labor sollte sein eigenes Titerschema etablieren, basierend auf den Antikörpern die in der Patientenpopulation nachgewiesen werden. Die Durchführung einer Endpunkt Titration zeigt jedoch alle in der Probe enthaltenen Muster welche oft maskiert werden und vermeidet damit Diskrepanzen zu den Folgetests. Auch wenn ein hoch-titriertes ANA als starkes Indiz für Bindegewebskrankheit zu sehen ist, ist der diagnostische Wert gering. Das Ergebnis sollte vielmehr in Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtprofil des Patienten bewertet werden.
6. Die Muster von Verfärbungen ändern sich oft mit fortschreitender Titrierung der Seren. Dieses Phänomen ist in der Regel auf das Vorhandensein von mehr als einem Antikörper zurückzuführen.
7. Wegen der zahlreichen für Fluoreszenz-Mikroskope verfügbaren Optionen empfehlen wir, bei Vergleichen von Patienten-Titrierungen zwischen verschiedenen Laboren mit standardisierten Lichtquellen, Filtern und optischen Geräten zu arbeiten.
8. Bei einem geringen Prozentsatz von Patienten mit infektiösen und/oder neoplastischen Krankheiten sind auch positive ANA sichtbar (9).
9. Autoantikörper gegen SSA/Ro weisen auf den transfizierten Zellen ein typisches Verfärbungsmuster auf. Ist dieses Muster vorhanden, so ist dies als Bestätigung für das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern zu werten. Andererseits ist durch das Fehlen eines solchen speziellen Musters das Vorhandensein von anti-SSA/Ro Antikörpern nicht auszuschließen.

10. Aufgrund der Überreaktion des SSA/Ro Autoantigens in den HEp-2000® Zellen, weisen Proben mit anti-SSA/Ro Antikörpern höhere Titrierungswerte in den Zellen auf, als die auf nicht-transfizierten HEp-2 Zellen ermittelten Werte. Da keines der übrigen Autoantigene in den HEp-2000® Zellen vom Transfektionsprozess betroffen ist, weisen Seren mit anderen Autoantikörper-Spezifitäten keine signifikanten Titrierungsunterschiede zwischen transfizierten HEp-2000® Zellen und nicht-transfizierten HEp-2 Zellen auf.

ZU ERWARTENDE WERTE

Die folgenden Daten wurden im Verlauf von zwei Jahren in einem medizinischen Zentrum einer großen Universität mithilfe eines HEp-2 ANA Zellsubstrats erstellt (49). Tabelle 1.

TABELLE 1

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

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

REFERENZBEREICH

Der Referenzbereich für den Nachweis antinukleärer Antikörper in der Normalbevölkerung ist „Negativ“. Wie in der obigen Tabelle dargelegt, zeigt ein kleiner Prozentsatz normaler Individuen ein positives ANA-Ergebnis. Jedes Labor muss auf Basis der jeweiligen Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren eigene Werte für Referenz-(Normal-)bereiche ermitteln und verwenden.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Das Immuno Concepts IgG Fluoreszenz ANA-Ro Testsystem wurde mit einem anderen kommerziell verfügbaren ANA-Ro Fluoreszenz Testsystem verglichen. Das Probenkollektiv umfasste 113 Proben, die zur ANA Testung an klinische Laboratorien geschickt wurden. Alle Proben wurden parallel in beiden Testansätzen untersucht. Im Vergleich wurden folgende Daten erhalten:

	Eigenschaften ANA-Ro Test	
	Positiv	Negativ
Immuno Concepts IgG ANA-Ro Test	Positiv 41	Negativ 3
	Negativ 0	69

Diese Daten ergeben folgende statistische Werte: Relative Sensitivität 100%; relative Spezifität 95,8%; positiver Vorhersagewert 93,2%; negativer Vorhersagewert 100% und Gesamtübereinstimmung 97,3%.

VERWENDUNG MIT DEM IMAGE NAVIGATOR®

Der Image Navigator® ist das halbautomatische Mikroskopsystem von Immuno Concepts zum Ablesen der HEp-2000® ANA-Fluoreszenzobjektträger. In einem Vergleich des Image Navigator® mit konventionellem Ablesen von ANA-Fluoreszenzobjektträgern wurden folgende Daten ermittelt:

Positive Übereinstimmung, 99,8 %; negative Übereinstimmung, 98,9 %; Gesamtübereinstimmung, 99,4 % (n = 739 Proben).

Die klinische Sensitivität für den Nachweis von ANA bei Patienten mit bekanntem systemischem Lupus erythematoses lag bei konventionellem Ablesen bei 93,8 % und beim Image Navigator® bei 94,1 %. Bei 301 Patienten mit bekannten

Bindegewbserkrankungen lag die klinische Sensitivität bei konventionellem Ablesen bei 82,7 % und beim Image Navigator® bei 83,1 %.

In einer Gruppe von 296 Patienten mit anderen Erkrankungen als Bindegewbserkrankungen und 142 gesunden Kontrollpersonen (insgesamt n = 438) wurde eine klinische Spezifität von 87,3% bei konventionellem Ablesen und 87,4 % beim Image Navigator® ermittelt.

BIBLIOGRAPHIE

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 Diagnostic Significance of 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 (Scl-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. Hahn, 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. Antinucleolar Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. *N.Engl. J. Med.* 282:1174-1178, 1970.
37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18:551-570, 1992.
38. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. *Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20.* American Society of Clinical Pathologists, 1980.
39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.
41. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). *Clin. Exp. Immunol.* 39:328-336, 1980.
42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. *Ann. Int. Med.* 77:553-541, 1972.
43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. *Clin. Exp. Immunol.* 21:339-344, 1975.
44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. *Clin Exp. Immunol.* 26:57-66, 1976.
45. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 24:266-272, 1976.
46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. *Arch. Int. Med.* 117:620-626, 1966.
47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560-567, 1978.
48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. *J. Rheum.* 5:142-147, 1978.
49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.
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.

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



Hersteller



Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft



Temperatur-Beschränkung



Enthält genügendes für <n> Tests



Beachten Sie die Anwendungsvorschriften



In vitro Medizinische Diagnoseeinheit



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Nur mit Rezept - Verschreibungspflichtig

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 E2000G-Ro-I, 4.11.02.003.110-De

Rev 4.2 © Copyright 2020

HEP-2000® IGG ANA-Ro FLUORESCENZ-TESTVERFAHREN

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

1. PUFFER (PBS) REKONSTITUIEREN

Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt bei 2-25°C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.

2. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN

Screening: Patientenproben 1:40 verdünnen, indem 0,05 ml (50 µl) Serum zu 1,95 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. • Semiquantitative Titrierung: Reihenverdünnungen der Serumprobe (z. B. 1:80, 1:160, 1:320...usw.) unter Verwendung von PBS herstellen.

3. SUBSTRATTRÄGER VORBEREITEN (20-25 µl/Vertiefung)

Objektträger aus der Folie entnehmen und Kontrollseren wie folgt in den Kontrollvertiefungen platzieren: Tropfflasche mit Kontrollserum umdrehen und vorsichtig drücken, bis an der Spitze ein Tropfen austritt. Den Tropfen vorsichtig in die entsprechende Kontrollvertiefung geben, dabei direkten Kontakt der Tropferspitze mit der Oberfläche des Objektträgers vermeiden. 1 Tropfen (20-25 µl) Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.

HINWEIS: Für allgemeine Screening-Verfahren wird die homogene Positivkontrolle empfohlen. Für die semiquantitative Titration sollte die titrierbare Kontrolle, Bestellnummer 2026, mit jeder Charge von Patientenproben durchgeführt werden. Alle Musterkontrollen sollten mit jeder Chargennummer von Kits durchgeführt werden, um das erwartete Erscheinungsbild der ANA-Muster zu demonstrieren. Falls der HEP-2000® ANA Test zur Bestätigung des Vorhandenseins von anti-SSA/Ro Antikörpern dient, muss die SSA/Ro Positivkontrolle, Katalognummer 2035-Ro, auf mindestens einem Objektträger am selben Tag mitlaufen.

ACHTUNG: DIREKTER KONTAKT DER TROPFERSPITZE MIT DEM OBJEKTTRÄGER KANN DAS ANTIGEN-SUBSTRAT BESCHÄDIGEN.

4. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei

Zimmertemperatur, 18-25°C)
Objektträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) abgedeckt inkubieren lassen.

5. PBS-SPÜLUNG

Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und mit Spritzflasche, Pasteur- oder serologischer Pipette kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.

6. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)

Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden. PBS-Waschlösung nach Gebrauch entsorgen.

7. FLUORESCENZ-ANTIKÖRPERREAGENS (Vertiefungen mit 12-14 Tropfen befüllen)

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen. Überschüssiges Wasser durch seitliches Ausklopfen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen. Objektträger sofort wieder in die Inkubationskammer geben und die Vertiefungen vollständig mit Fluoreszenz-Antikörperreagens füllen; beginnend mit einem Tropfen pro Vertiefung. Vorgang für alle Objektträger wiederholen. Das Fluoreszenz-Antikörperreagens wurde titriert, um für auf dem Objektträger verbliebenes deionisiertes oder destilliertes Wasser zu kompensieren.

HINWEIS: Es ist wichtig, dass die Vertiefungen auf dem Objektträger während dieses Vorgangs nicht austrocknen, andernfalls kann das Substrat beschädigt werden.

DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE FLUORESCENZ-ANTIKÖRPERREAGENS STEHEN LASSEN.

8. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei

Zimmertemperatur, 18-25°C)
Deckel auf Inkubationskammer setzen und mit Papierhandtuch abdecken, um das Eindringen von Licht zu vermeiden, falls die Kammer durchsichtig ist. Objektträger 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubieren lassen.

9. PBS-SPÜLUNG

Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.

10. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)

Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden, wenn keine Gegenfärbung verwendet wird. Optionale Gegenfärbung: Vor dem Eintauchen des Objektträgers 5-10 Tropfen Gegenfärbung (0,5% Evans blau) pro 100 ml PBS hinzugeben. Da je nach Patient unterschiedliche Grade von Gegenfärbung gewünscht sind, kann die Intensität der Gegenfärbung durch die Anzahl der in diesem Waschgang zum PBS hinzugegebenen Tropfen problemlos erhöht oder verringert werden.

11. DECKGLAS AUFSETZEN

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen (Optionale). Überschüssiges Wasser durch seitliches Ausklopfen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen. DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE DECKGLAS STEHEN LASSEN. 4-5 Tropfen semipermanentes Montagemedium entlang der Mittellinie jedes Objektträgers hinzugeben. Deckglas vorsichtig in Position bringen; dabei Lufteinschlüsse vermeiden; hierzu das Deckglas vorsichtig an einem Ende des Objektträgers aufsetzen und auf das andere Ende herablassen.

HINWEIS: Überschüssiges Montagemedium auf dem Objektträger kann wegen der Lichtstreuung oder wegen ungenügender Auflösung der Zellen (verschwommenes Bild) zu einem hohen Fluoreszenz-Hintergrund führen. Überschüssiges Montagemedium kann vom Objektträger entfernt werden, indem das Deckglas mit Saugpapier abgetupft wird, ohne es dabei zu bewegen.

12. ABLESEN DES OBJEKTTRÄGERS

Wenn der Objektträger mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie abgelesen werden soll, kann dieser sofort nach dem Standardverfahren des Labors abgelesen werden. Objektträger müssen immer von einem geschulten Anwender abgelesen werden, der mit der Interpretation und Fluoreszenzmustern von ANA vertraut ist. Informationen zur Verwendung des Mikroskops erhalten Sie vom Anbieter des Fluoreszenzmikroskops.

Wenn der Objektträger mit dem Image Navigator®, dem automatischen Mikroskopie- und Bilderfassungssystem von Immuno Concepts, abgelesen werden soll, ziehen Sie das Bedienungshandbuch für das Image Navigator® System zu Rate. Der Image Navigator® darf nur von einem geschulten Anwender bedient werden.

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

* Labore, die das Screening in einer anderen Verdünnung als der empfohlenen Verdünnung durchführen möchten, müssen die Verwendung der alternativen Screening-Verdünnung in ihrer Patientenpopulation validieren.