



HISTOFLUOR[®]-NAGETIER-LKS FLUORESZIERENDE ANTIKÖRPER-TESTSYSTEM

**Nur zur in vitro-Diagnostik
Nur für Fachpersonal bestimmt**

VERWENDUNGSZWECK: Dies ist ein indirekter Fluoreszierender Antikörpertest für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG-Autoantikörpern in humanem Serum mittels manueller Fluoreszenzmikroskopie oder mit dem halbautomatischen Fluoreszenzmikroskop Image Navigator[®]. Dieses Testsystem soll als Hilfsmittel beim Nachweis von Antimitochondrialen Autoantikörpern (AMA), Anti-Parietalzellen-Autoantikörpern (APCA) und Autoantikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA) im Zusammenhang mit Autoimmunhepatitis Typ 1, primär biliärer Cholangitis und perniziöser Anämie/autoimmuner Gastritis in Verbindung mit anderen Labor und klinischen Befunden eingesetzt werden. Ein geschulter Bedienender muss die mit dem halbautomatischen Gerät und der Software Image Navigator[®] erzeugten Ergebnisse bestätigen.

ÜBERSICHT UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Autoantikörper im Menschen richten sich gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene. Viele dieser Antigene sind stark konserviert, so dass nahezu identische Antigen-Epitope in den tierischem und humanem Gewebe zu finden sind. Daher ist die Verwendung von Tiergewebe für die Detektion dieser Antikörper ein seit langem angewendetes Laborverfahren. Viele der in Tiergewebe detektierten Autoantikörper stehen in engem Zusammenhang mit bestimmten Autoimmunerkrankungen beim Menschen. Detektion und Quantifizierung spezifischer Autoantikörper ermöglichen die Diagnose und Überwachung spezifischer Autoimmunerkrankungen (1,2).

TESTPRINZIP

Das Histofluor[®]-Nagetier-LKS-Testsystem von Immuno Concepts bedient sich der indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertechnik, die erstmals von Weller und Coons beschrieben wurde (3). Patientenproben werden mit Antigensubstrat (Leber/Niere/Magen von Nagetieren) inkubiert, um die spezifische Bindung von Autoantikörpern an Zellkomponenten zu ermöglichen. Wenn Autoantikörper vorhanden sind, wird ein stabiler Antigen-Antikörper-Komplex gebildet. Nach dem Waschen zur Entfernung nicht-spezifischer und ungebundener Antikörper wird das Substrat mit einem Fluorescein-konjugierten Anti-Human-Antikörper inkubiert. Wenn die Ergebnisse positiv sind, hat sich ein stabiler Komplex aus drei Teilen gebildet, der aus fluoreszierendem Antikörper besteht, der an humanen Autoantikörper gebunden ist, der wiederum an zelluläres Antigen gebunden ist. Dieser Komplex kann mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops visualisiert werden. Bei Positivproben weisen die Zellen eine apfelgrüne Fluoreszenz mit einem Färbungsmustermerkmal für eine bestimmte Antigenverteilung innerhalb der Zellen auf. Wenn die Probe negativ auf Autoantikörper getestet wurde, weisen die Zellen kein deutlich erkennbares Fluoreszenzmuster auf.

SYSTEMKOMPONENTEN – IM LIEFERUMFANG

Verwendung: Alle Komponenten werden gebrauchsfertig geliefert, ohne dass eine Aliquotierung oder Rekonstitution erforderlich wäre (mit Ausnahme des PBS-Puffers, der vor Verwendung in entionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden muss).

Aufbewahrung: Alle Komponenten können bei einer Temperatur von 2–10 °C aufbewahrt werden. Nach Rekonstitution sollte der PBS-Puffer möglichst in verschraubbaren Behältern bei 2–25 °C aufbewahrt werden. Das Eindeckmedium kann bei 2–25 °C gelagert werden.

Haltbarkeit: Die Komponenten sind mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Komponenten nicht mehr verwenden, wenn das Verfalldatum überschritten ist.

REAKTIVE REAGENZIEN

Substratträger **SLIDE**:

Dünne (etwa 4–5 Mikrometer) Abschnitte von Leber, Niere, Magen oder Niere und Magen von Nagetieren. Die Gewebe wurden in einer proprietären Mischung aus Aceton, Alkoholen und anderen organischen Lösungsmitteln fixiert, um die Gewebeproteine in ihrer natürlichen Konfiguration zu erhalten. Die Objektträger sind als vierfache Objektträger (Maus, Katalognummer 12004-02; Ratte, Katalognummer 12004-03) und achtfache Objektträger (Maus, Katalognummer 12008-02; Ratte, Katalognummer 12008-03) erhältlich. KS-Objektträger sind als vierfache Objektträger (Maus, Katalognummer 12004-04; Ratte, Katalognummer 12004-05) und achtfache Objektträger (Maus, Katalognummer 12008-04; Ratte, Katalognummer 12008-05) erhältlich.

Positivkontrollserum für spezifische antimitchondriale Antikörper **CONTROL +**: Katalognr. 12021-02 (1,0 ml) - AMA. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml positives Humankontrollserum mit für mitochondriale Antigene spezifischen Antikörpern. Dieses Serum weist ein positives antimitchondriales Färbungsmuster auf dem Nagetiergewebesubstrat auf.

Negativkontrollserum **CONTROL -**: Katalognr. 12031. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 1,0 ml negativem Humankontrollserum. Diese Kontrolle kann eine schwach fluoreszierende Färbung, aber kein deutliches Muster aufweisen.

Fluoreszenz-Antikörperreagens **CONJFITC**: Katalog-Nr. 12009-02 (9,0 ml), 12075-02 (23 ml). Ziege-Anti-Human-IgG (Gamma) konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Reagens gebrauchsfertig in Präzisionstropffläschchen mit 9,0 ml für alle 10 Objektträger im Lieferumfang enthalten.

Optionale Positivkontrolle **CONTROL** +:

Katalognummer 12022-02 (0,5 ml) – Anti-Parietalzellen-Antikörper (APCA).

Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 0,5 ml positivem humanem Kontrollserum mit IgG- Antikörper, der spezifisch für Parietalzellen-Antigene ist. Dieses Serum zeigt ein positives Anti-Parietalzellenmuster auf dem Nagetiergewebesubstrat.

Katalognummer 12023-02 (0,5 ml) – Glatte-Muskulatur-Antikörper (ASMA).

Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 0,5ml positivem humanem Kontrollserum mit IgG- Antikörper, der spezifisch für Glatte-Muskulatur-Antigene ist. Mit diesem Serum lässt sich ein positives Färbemuster von Antikörpern gegen die glatte Muskulatur auf dem Gewebesubstrat von Nagetieren nachweisen.

Optionale Titrierbare Kontrollseren **TC**:

Katalognummer: 12261-02 (0,25 ml) - AMA.

Gebrauchsfertiges Flaschen mit 0,25 ml antimitchondrialem positivem humanem Kontrollserum, das als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln ist. Siehe Flaschenetikett für den Titerwert.

Katalognummer: 12262-02 (0,25 ml) – APCA.

Gebrauchsfertiges Flaschen mit 0,25 ml positivem humanem Kontrollserum mit Anti-Parietalzellen, das als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln ist. Siehe Flaschenetikett für den Titerwert.

Katalognummer: 12263-02 (0,25 ml) – ASMA.

Gebrauchsfertiges Flaschen mit 0,25 ml positivem humanem Kontrollserum gegen glatte Muskulatur, das als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln ist. Siehe Flaschenetikett für den Titerwert.

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

PBS-Pufferpulver **PWDR|PBS**: Katalognr. 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für einen Liter Pufferlösung. (Ein Beutel Pufferpulver für 5 Objektträger ist im Lieferumfang enthalten.)

Herstellung: Einen Beutel Pufferpulver in 1 Liter entionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen, abdecken und bis zu vier Wochen oder bis Anzeichen einer Kontamination oder andere sichtbare Änderungen auftreten bei 2–25 °C aufbewahren.

Semipermanentes Eindeckmedium **SOLN|MM**: Katalognummer 1111. Gebrauchsfertiges Tropffläschchen mit 5,0 ml Glycerol-basiertem Eindeckmedium.

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

WEITERE ERFORDERLICHE MATERIALIEN – NICHT MITGELIEFERT

Volumetrische Pipetten für Volumina von 30-40 µl.

Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen

Spritzflasche oder Pasteur-Pipetten

Serologische Pipetten

Mehrere 1-Liter-Behälter (für PBS-Puffer)

Entionisiertes oder destilliertes Wasser

Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen

Saugpapier oder Papierhandtücher

Behälter zu Inkubation

Einmalhandschuhe

Labor-Stoppuhr

Fluoreszenz-Mikroskop mit 495 nm-Erregerfilter und 515 nm-Sperrfilter

SICHERHEITSHINWEISE

1. Alle in diesem Produkt verwendeten Materialien humanen 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 Erreger vom Typ HIV-1, HIV-2, Hepatitis C, Hepatitis B bzw. andere Infektionserreger vorhanden sind. Daher müssen alle Materialien des Kits wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben müssen nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie im Handbuch der Centers for Disease Control/National Institutes of Health für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ausgabe 1999, empfohlen*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder die Zugabe von nicht zum System gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Natriumazid (0,09 %) wird als Konservierungsmittel in einigen Reagenzien verwendet. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren in Abflüssen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen stets mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Dieses Kit ist 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. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht essen, trinken oder rauchen.
8. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
9. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten bzw. -temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
10. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Wieder verwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um alle Rückstände von Reinigungsmitteln zu entfernen. Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
12. Alle Reagenzien, Objektträger und Proben vor Gebrauch Raumtemperatur (18-25 °C) annehmen lassen.
13. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien müssen Einmalhandschuhe getragen werden. Anschließend die Hände gründlich waschen.
14. Mikrobielle Verunreinigungen der Reagenzien oder Proben können das Ergebnis verfälschen.
15. Niemals mundpipettieren und Haut- und Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Bei versehentlichem Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife abwaschen.

PROBENGEWINNUNG

Probennahme: Die Tests sollten nach Möglichkeit an Serumproben durchgeführt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Raumtemperatur (18–25 °C) gerinnen lassen. Zur Vermeidung von Hämolyse muss das Serum anschließend so bald wie möglich durch Zentrifugieren abgetrennt werden.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, da die Ergebnisse in diesen Fällen verfälscht werden können. Proben, in denen Feststoffe sichtbar sind, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Serumproben können bei 2–10 °C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Bei einer weiteren Verzögerung der Tests sollten die Proben bei höchstens –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 sind falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse möglich.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv-, Negativ- und PBS-Kontrollen müssen in jeweils einzelnen Durchläufen erfolgen. Die Positivkontrolle sollte eine helle apfelgrüne Fluoreszenz in den jeweiligen Gewebestrukturen mit einem deutlich erkennbaren Muster des verwendeten Kontrollserums aufweisen. Die Negativkontrolle sollte eine wenig intensive, unspezifische, trüb grüne Fluoreszenz in Zytoplasma und Nukleus ohne erkennbares Färbungsmuster aufweisen. Die PBS-Kontrolle wird zur Beobachtung nicht spezifischer Färbung durch Antikörperreagenzien verwendet und sollte keine grüne Fluoreszenz aufweisen. Wenn die Kontrollen sich nicht wie beschrieben darstellen, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

Es ist wichtig, die Intensität der Fluoreszenz nicht mit dem Vorliegen oder Nichtvorliegen von Antikörpern zu verwechseln. Der wichtigste Faktor, der bei der Entscheidung darüber, ob eine bestimmte Serumverdünnung positiv ist, zu berücksichtigen ist, ist das Vorliegen eines deutlich erkennbaren Musters, ungeachtet der Intensität der Fluoreszenzfärbung.

Nagetier-Nieren-/Magen-/Leber-Fluoreszenz-Antikörpertestsystem

OPTIONALE TITRIERBARE KONTROLLEN

Die titrierbaren Kontrollseren sind für die Überwachung der Lot-to-Lot- und Run-to-Run- Reproduzierbarkeit vorgesehen. Sie sind nicht als Maß für die allgemeine Empfindlichkeit oder Spezifität der Probe gedacht.

Beim Lesen von Titern beginnen viele Laboratorien mit dem Well, welches die am stärksten verdünnte Lösung enthält und lesen "rückwärts" bis zur 1:20 - Verdünnung.

Der für diese Chargennummer bestimmte Durchschnittstiter sowie der Titerbereich ($\pm$ eine Verdünnung auf jeder Seite des Durchschnittswertes) wurden in unserem Labor etabliert und gelten als Richtlinie. Mit dieser Kontrolle kann jedes Labor die Reproduzierbarkeit (Genauigkeit) seiner Tests bewerten. Da diese Kontrolle nicht als Indikator für die Exaktheit des Titers gedacht ist, sollte jedes Labor seinen eigenen Durchschnittstiter-Endpunkt für diese Probe etablieren und diese Information verwenden, um die Reproduzierbarkeit (Genauigkeit) jedes Durchlaufs einzeln zu bewerten.

Durch mehrmaliges Testen der titrierbaren Kontrolle mit Hilfe des Histofluor[®] Nagetier LKS Fluoreszenz-Antikörper-Testsystem von Immuno Concepts wurde für jede Chargennummer ein Durchschnittstiterwert etabliert. Die Chargennummer, der Durchschnittstiter und der Titerbereich ($\pm$ die zweifache Verdünnung auf jeder Seite des Durchschnittswertes) sind auf dem Flaschenetikett angegeben und sollten als Richtlinie bei der Durchführung des Tests herangezogen werden.

Die in unserem Labor erhaltenen Werte können sich von Ihren Werten unterscheiden.

Einige von vielen Faktoren, die die Ergebnisse beeinflussen können, sind unter anderem:

1. Die Art der verwendeten Lichtquelle. Quecksilber-Lichtquellen erzeugen eine größere Erregungsenergie bei 495 nm als Quartz/Halogen-Lichtquellen. Die Quecksilber-Lichtquellen mit 50 Watt, 100 Watt und 200 Watt unterscheiden sich bei 495 nm nur unwesentlich in der Erregungsenergie. Quartz/Halogen-Lichtquellen mit 100 Watt erzeugen eine größere Erregungsenergie bei 495 nm als Quartz/Halogen-Lichtquellen mit 50 Watt.

2. Zustand und Alter der Lichtquelle. Dies spielt insbesondere bei Quecksilber-Lichtquellen eine Rolle, die vor dem Ausbrennen eine stufenweise Reduzierung der Erregungsenergie bei 495 nm aufweisen. Diese stufenweise Reduzierung der Erregungsenergie kann über mehrere Wochen hinweg zu einem erheblichen Empfindlichkeitsverlust führen. Dieses Problem kann durch das Führen eines Zeitprotokolls vermieden werden. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten 50 Watt-Quecksilberlampen alle 100 Stunden und 100 oder 200 Watt-Quecksilberlampen alle 200 Stunden ausgetauscht werden. Quartz/Halogen-Lichtquellen weisen im Allgemeinen vor dem Ausbrennen keine stufenweise Reduzierung der Erregungsenergie auf.
3. Die Art des verwendeten Erregerfilters. Interferenzerregerfilter liefern eine größere Empfindlichkeit über eine viel schmalere Wellenlänge als Absorptionserregerfilter. Für weitere Informationen lesen Sie das Handbuch Ihres Fluoreszenz-Mikroskops oder kontaktieren Ihren Mikroskop-Vertriebshändler.
4. Richtige Ausrichtung des Lichtwegs des Mikroskops. Anweisungen hierzu finden Sie im Handbuch Ihres Fluoreszenz-Mikroskops.
5. Die numerische Apertur des Objektivs. Bei der Auflicht-Fluoreszenz (Epi) ist die Fluoreszenz exponentiell erhöht, da die numerische Apertur (NA) des Objektivs sich additiv erhöht. Dies kann dazu führen, dass ein 40X-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,65 eine oder mehrere Verdünnungen niedriger als ein 40X-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,85 ausliest. Die numerische Apertur ist auf der Objektivseite aufgedruckt.
6. Entstörfilter. Entstörfilter reduzieren spezifische Anregungswellenlängen und können zur Reduzierung der Empfindlichkeit verwendet werden. Für weitere Informationen lesen Sie das Handbuch Ihres Fluoreszenz-Mikroskops oder kontaktieren Ihren Mikroskop-Vertriebshändler.
7. Die Präzision und Genauigkeit von Verdünnungstechnik, Geräten sowie Leistung der Testverfahren.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

100-fache Gesamtvergrößerung wird für das Positiv-/Negativ-Screening empfohlen, während 200-fache Gesamtvergrößerung für die Mustererkennung empfohlen wird.

Negativ: Ein Serum gilt als negativ, wenn kein deutlich erkennbares Muster vorliegt. Das Gewebe kann eine schwache Färbung, jedoch ohne deutlich erkennbares Muster aufweisen.

Positiv: Ein Serum gilt als positiv, wenn das Gewebe ein deutlich erkennbares Färbungsmuster aufweist.

Titers: Beim Lesen von Titern beginnen viele Laboratorien mit dem Well, welches die am stärksten verdünnte Lösung enthält und lesen "rückwärts" bis zur 1:20 - Verdünnung. Des erste Well, in dem ein klar erkennbares Muster zu sehen ist, ist der Endpunkt des Titers. Wir empfehlen diese Methode, wenn der Endpunkt eines Titers bestimmt werden soll. Es ist wichtig, die Intensität der Färbung nicht mit der An- oder Abwesenheit antimitochondrialer oder antiparietaler Antikörper zu verwechseln. Worauf es bei der Bestimmung, ob eine vorgegebene Serumverdünnung positiv ist, ankommt, ist das Auftreten eines klar erkennbaren Musters. Die Färbungsintensität ist irrelevant.

ANGABE DER ERGEBNISSE

Screening: Die Ergebnisse des Tests sind als positiv oder negativ bei 1:20-Verdünnung anzugeben, und das Färbungsmuster ist anzugeben.

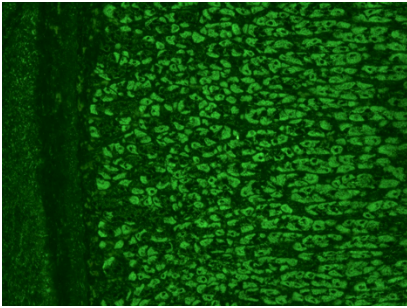
Titerbestimmung: Ergebnisse sollten als letzte Serienverdünnung, in der ein klar erkennbares Muster zu sehen ist, formuliert werden. Ergebnisse mit einer starken Reaktion in der 1:320- Verdünnung sollten als größer als 1:320 formuliert werden.

MUSTERDETEKTION

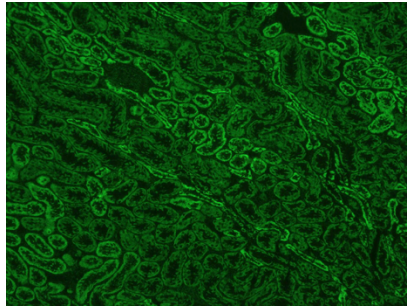
Antimitochondriale Antikörper (AMA): Granularfärbung des Zytoplasmas der Kupffer-Zellen und Hepatozyten in den Leberabschnitten; Granularfärbung des Zytoplasmas erfolgt auch in den Nierentubuli, wobei die stärkste Färbung in den distalen Tubuli vorliegt, die mehr Mitochondrien aufweisen als die proximalen Tubuli; das Zytoplasma von Magenzellen weist ebenfalls eine Granularfärbung auf, wobei die Parietalzellen eine stärkere Färbung **als die** Hauptzellen aufweisen.

Antigen: Das am häufigsten detektierte Antigen in den Mitochondrien ist M2, wobei es sich um einen Komplex aus mehreren Antigen-Peptiden des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDH) handelt.

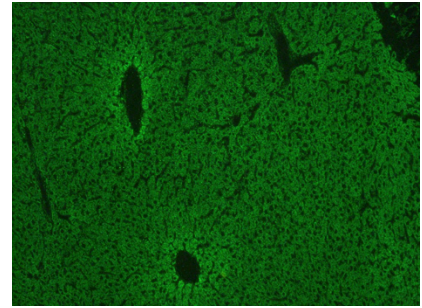
Assoziierte Erkrankung: AMA lassen sich bei 95 % der Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) (4,5).



AMA auf Nagetier-Magenzellen



AMA auf Nagetier-Nierenzellen

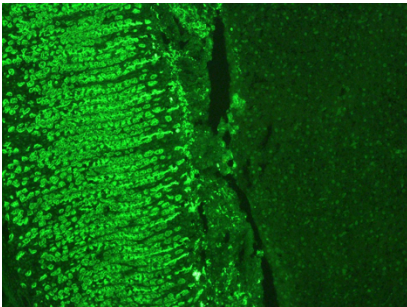


AMA auf Nagetier-Leberzellen

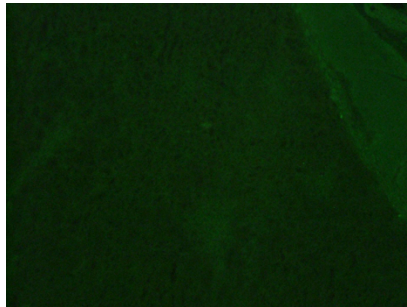
Anti-Parietalzellen-Antikörper (APCA): Im Magen weist das Gewebe eine helle Granularfärbung des Zytoplasmas der Parietalzellen in einem parallelen Linearmuster auf, wobei die Hauptzellen keine Färbung aufweisen. Das Antigen ist in Nieren oder Leber von Nagetieren nicht exprimiert, sodass dieses Gewebe negativ ist und nur der Hintergrund fluoresziert.

Antigen: Das Antigen ist die Kalium-Protonen-Pumpe (H⁺K⁺ATPase).

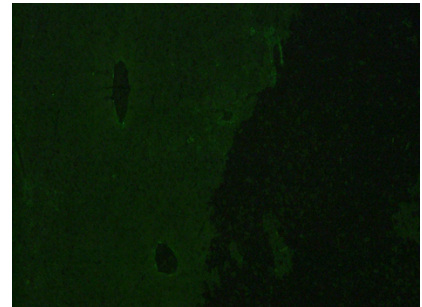
Assoziierte Erkrankung: APCA liegen bei über 90 % der Patienten mit perniziöser Anämie vor. Atrophische Gastritis geht häufig einer perniziösen Anämie voraus, sodass Antikörper auch bei Patienten mit atrophischer Gastritis zu finden sind (6,7).



APCA auf Nagetier-Magenzellen



APCA auf Nagetier-Nierenzellen (negativ)



APCA auf Nagetier-Leberzellen (negativ)

Glatte-Muskulatur-Antikörper (ASMA): Im Magen zeigt das Gewebe eine helle Färbung der glatten Muskelfasern in der Tunica muscularis, der Lamina muscularis mucosae, dem Magen-Drüsen-Bereich und den glatten Muskelschichten von Arterien. In der Leber weist das Gewebe eine helle Färbung glatter Muskelfasern in den Wänden der Arterien auf. In den Nieren können hohe Titer der Anti-Aktin-Antikörper zu Kreuzreaktionen mit Tubulinfasern in den Glomeruli führen.

Antigen: Aktin ist das klinisch wichtigste Antigen, doch Antikörper gegen Vimentin, Tubulin, Desmin und andere Proteine in den glatten Muskelfasern sind ebenfalls beschrieben worden.

Assoziierte Erkrankung: Chronische Autoimmunhepatitis (Typ 1) (8-10).

BESCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Der Nachweis von Nagetiergewebe-Antikörpern allein ist für eine Diagnose nicht ausreichend. Diese Ergebnisse müssen immer im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den Symptomen des Patienten, dem körperlichen Befund und anderen diagnostischen Methoden interpretiert werden.
2. Lediglich auf Basis eines positiven Tests auf Antikörper darf keine Behandlung initiiert werden. Für den Beginn einer Therapie müssen klinische Symptome, weitere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Arztes herangezogen werden.
3. Selbst wenn eine positive Reaktion ein starkes Indiz für eine Erkrankung des Bindegewebes darstellt, ist der diagnostische Wert gering und eher als Teil der allgemeinen Anamnese eines Patienten zu werten.
4. Die Färbemuster können sich mit der progressiven Titration von Seren ändern. Dieses Phänomen tritt im Allgemeinen auf, wenn mehr als eine Erkrankung vorliegt.
5. Angesichts der vielen Möglichkeiten, über die Fluoreszenz-Mikroskope verfügen, wird eine Standardisierung von Lichtquellen, Filter und Optik für den Vergleich von Patiententiter zwischen den Laboren empfohlen.
6. Immuno Concepts empfiehlt die Verwendung gezüchteter, transgenerierter Zellen (HEp-2000®) für die Bestimmung von ANA und rät von einer Verwendung von Nagetiergewebe für die Detektion oder Identifizierung von ANA ab.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Das Histofluor®-Nagetier-LKS-Testsystem wurde mit einem anderen immunfluoreszierenden Antikörper-Testkit für Nagetiergewebe verglichen, das sich in kommerziellem Vertrieb befindet und 170 klinisch charakterisierte Proben verwendet. Die Proben wurden an drei Standorten getestet und von drei Bedienenden an jedem Standort abgelesen. Mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wurden die folgenden Daten gewonnen. Die Einigungswerte stellen eine Konsensentscheidung der besten zwei von drei Ernennungen der drei Standorte dar.

Rattengewebe

Positiv Einigung: 92,3% (79,0 - 98,1)
 Mustereinigung: 92,3% (79,0 - 98,1)
 Negativ Einigung: 97,8% (93,4 - 99,5)
 Gesamteinigung: 98,2% (94,7 - 99,6)

Mausgewebe

Positiv Einigung: 94,4% (80,9 - 99,4)
 Mustereinigung: 94,4% (80,9 - 99,4)
 Negativ Einigung: 98,5% (94,5 - 99,9)
 Gesamteinigung: 98,8% (95,5 - 99,9)

Verwendung Mit Dem Image Navigator®

Der Image Navigator® ist das halbautomatische Mikroskopsystem von Immuno Concepts zum Lesen der Histofluor®-Fluoreszenzobjektträger. Ein Vergleich der Ablesung des Image Navigator®-Monitors mit der herkömmlichen Ablesung der fluoreszierenden Nagetiergewebeobjektträger des Histofluor®-Nagetier-LKS-Testsystems wurde mit 170 klinisch charakterisierten Proben durchgeführt, die an drei Standorten getestet und von drei Bedienenden an jedem Standort abgelesen wurden. Die Einigungswerte stellen eine Konsensentscheidung der besten zwei von drei Ernennungen der drei Standorte dar.

Rattengewebe

Positiv Einigung: 100% (87,9 - 100)
 Mustereinigung: 100% (87,9 - 100)
 Negativ Einigung: 100% (96,6 - 100)
 Gesamteinigung: 100% (97,3 - 100)

Mausgewebe

Positiv Einigung: 100% (88,5 - 100)
 Mustereinigung: 100% (88,5 - 100)
 Negativ Einigung: 100% (96,7 - 100)
 Gesamteinigung: 100% (97,3 - 100)

Die klinische Sensitivität für den Nachweis von Autoantikörpern bei Patienten mit bekannter perniziöser Anämie, Autoimmunhepatitis Typ 1 oder primär biliärer Cholangitis ist in den folgenden Tabellen dargestellt. In diesen Studien wurde eine Cutoff-Verdünnung von 1:20 verwendet, um positive Proben zu bestimmen.

Klinische Sensitivität (95% CI)		Histofluor®-Maus-Leber/Niere/Magen			
Diagnose	N	Konventionell	% Positiv	Image Navigator®	% Positiv
Perniziösen Anämie	12	5	41.7% (19.3-68.1)	5	41.7% (19.3-68.1)
Autoimmunhepatitis Typ 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Primär Biliärer Cholangitis	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

Klinische Sensitivität (95% CI)		Histofluor®-Ratte-Leber/Niere/Magen			
Diagnose	N	Konventionell	% Positiv	Image Navigator®	% Positiv
Perniziösen Anämie	12	6	50.0% (25.4-74.6)	6	50.0% (25.4-74.6)
Autoimmunhepatitis Typ 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Primär Biliärer Cholangitis	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

Die klinische Spezifität wurde bei einer Gruppe von 121 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als der perniziösen Anämie, Autoimmunhepatitis Typ 1 oder der primären biliären Cholangitis bestimmt. Die Daten aus diesen Vergleichen sind in der folgenden Tabelle dargestellt. In diesen Studien wurde eine Cutoff-Verdünnung von 1:20 verwendet, um positiv Proben zu bestimmen.

Klinische Spezifität (95% CI)		Histofluor®-Maus-Leber/Niere/Magen			
Gruppe	N	Konventionell	% Negativ	Image Navigator®	% Negativ
Autoimmunpatienten	121	114	94.2% (88.3-97.4)	114	94.2% (88.3-97.4)

Klinische Spezifität (95% CI)		Histofluor®-Ratte-Leber/Niere/Magen			
Gruppe	N	Konventionell	% Negativ	Image Navigator®	% Negativ
Autoimmunpatienten	121	113	93.4% (87.3-96.8)	113	93.4% (87.3-96.8)

Präzision: Gemäß den Anforderungen von CLSI EP05-A3 wurden dreizehn Proben in dreifacher Ausfertigung bei zehn Vorgängen an drei unabhängigen Standorten getestet. Das Probenset umfasste vier AMA-positiv Proben, vier APCA-positiv Proben, vier ASMA-positiv Proben und eine negativ Probe. Jedes Ergebnis wurde konventionell und der Image Navigator® von zwei Lesern abgelesen. Um die Daten in einem semi-quantitativen Format darzustellen, wird unten die Titer-endpunktvereinbarung unten für Standorte zwischen Standorten angegeben. Alle Einigungen lagen bei > 90,0 %.

Multi-Standort, Multi-Leser Reproduzierbarkeit (% Einigungen mit 95 % CI)								
Substrat	Maß	n	Konventionell			Monitor (halbautomatisch)		
			Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3	Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3
RATTE	Positiv	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	Negativ	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Muster	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	± 1 Titer	720	95.4% (93.6-96.7)	95.8% (94.1-97.1)	96.5% (94.9-97.7)	95.3% (93.5-96.6)	95.3% (93.5-96.6)	96.7% (95.1-97.8)
MAUS	Positiv	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	Negativ	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Muster	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	± 1 Titer	720	94.9% (93.0-96.3)	97.8% (96.4-98.7)	94.4% (92.5-95.9)	96.8% (95.2-97.9)	98.9% (97.8-99.5)	96.5% (94.9-97.7)

LITERATURANGABEN

1. Nakamura RM, Chisari FV, Edington TS. Laboratory tests for diagnosis of autoimmune diseases. *Prog Clin Pathol.* 1975;6:177-203.
2. Craig WY, Ledue TB, Collins MF, et al. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:1283-1286.
3. Weller TH, Coons AH. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;86:789-794.
4. Jones DEJ. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol.* 2000;53:813-821.
5. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol.* 2015;7:926-941.
6. Toh B-H. Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. *Immunol Res.* 2017;65:326-330.
7. De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh B-H. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. *NEJM.* 1983;309:625-629.
8. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies and autoimmune hepatitis. *J Autoimm.* 2013;46:17-24.
9. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target the auto antigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med.* 2002;13:293-303.
10. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;30:394-401.

Bei einer Beschädigung der Schutzverpackung bitte vor dem Gebrauch mit Immuno Concepts in Verbindung setzen.



Temperatur-
beschränkung



Autorisierter Repräsentant in
der Europäischen Gemein-
schaft



Hersteller



Enthält genügendes für <n>
Tests



Beachten Sie die Anwen-
dungsvorschriften



Medizinische In Vitro-
Diagnoseeinheit



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hanover



Nur mit Rezept - Verschreibungspflichtig

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technischer Support USA: 1.800.251.5115 Außerhalb der USA: 1.916.363.2649
E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 12000-02-I,

4.11.02.003.140-De

Rev. 2.1

© Copyright 2019

HISTOFLUOR®-NAGETIERGEWEBE-FLUORESZENZ-TESTMETHODE

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

Den Inhalt eines Beutels Pufferpulver in einem Liter entionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Der PBS-Puffer kann verschlossen bei 2–25 °C gekühlt bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.

2. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN

Screening: Patientenproben 1:20 verdünnen, indem 0,05 ml (50 µl) Serum zu 0,95 ml (950 µl) rekonstituiertem PBS zugegeben werden.

Semiquantitative Titerbestimmung: Stellen Sie mit PBS Serienverdünnungen einer Probe/von Proben sowie die titrierbare Kontrolle her (z. B. 1:40, 1:80, 1:160, 1:320).

3. SUBSTRATTRÄGER VORBEREITEN (30–40 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 (30–40 µl) Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.

HINWEIS: Für ein allgemeines Screening wird die antimitochondriale Positivkontrolle empfohlen. Für die semi-quantitative Titrierung, eine titrierbare Kontrolle, sollte entweder die Katalognummer 12261-02, 12262-02 oder 12263-02 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.

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

4. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur, d. h. 18–24 °C).

Objektträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Raumtemperatur (18–24 °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.

HINWEIS: Um bei Objektträgern eine Kreuzkontamination zu vermeiden, den PBS direkt auf die Mittellinie des Objektträgers spritzen, dabei den Träger zuerst in Richtung der oberen Reihe der Vertiefungen neigen und danach in Richtung der unteren Reihe der Vertiefungen.

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. FLUORESZENZ-ANTIKÖRPERREAGENS (Vertiefungen mit 12–14 Tropfen befüllen)

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen. Überschüssiges Wasser durch 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 nach dem Spülen auf dem Objektträger verbliebenen Puffer 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 FLUORESZENZ-ANTIKÖRPERREAGENS STEHEN LASSEN.

8. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur, d. h. 18–24 °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 Raumtemperatur (18–24 °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.

11. DECKGLAS AUFSETZEN

Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen. Überschüssiges Wasser durch Ausklopfen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen.

OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE DECKGLAS STEHEN LASSEN. 4–5 Tropfen semipermanentes Eindeckmedium entlang der Mittellinie jedes Objektträgers hinzugeben. Deckglas vorsichtig in Position bringen; dabei Luftschlüsse vermeiden; hierzu das Deckglas vorsichtig an einem Ende des Objektträgers aufsetzen und auf das andere Ende herablassen.

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

12. Objektträger Auslesen

Wird der Objektträger mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen, kann dies sofort unter Anwendung der Standardmethode des Labors erfolgen. Objektträger müssen immer von einer unterwiesenen Person ausgelesen werden, die mit der Interpretierung sowie mit Mustern von Fluoreszenzgewebeschnitten vertraut ist. Für Hinweise zur Verwendung des Fluoreszenzmikroskops wenden Sie sich an den Lieferanten.

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. Image Navigator® schießt Bilder von jedem einzelnen Well und erstellt eine Panoramaansicht des Gewebeschnittes, den die unterwiesene Person dann begutachten kann. Der Image Navigator® darf nur von einem geschulten Anwender bedient werden.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG:

USA: 1-800-251-5115 Außerhalb der USA: 1-916-363-2649

E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

