

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

NOVA Lite™ HEp-2 ist ein indirektes Immunfluoreszenz-Testsystem zum Screenen und semi-quantitativen Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) im Humanserum. Die Gegenwart von antinukleären Antikörpern kann in Verbindung mit anderen serologischen Tests und klinischen Befunden bei der Diagnose von Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und anderen Bindegewebs- oder rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden.

Informationen zum Test

Die Bezeichnung „antinukleäre Antikörper“ (ANA) beschreibt eine Vielzahl von Autoantikörper, die mit den Bestandteilen des Zellkerns, einschließlich DNA, RNA sowie mehreren Proteinen und Ribonukleoproteinen reagieren.¹ Diese Autoantikörper treten sehr häufig bei Patienten mit Bindegewebs- oder rheumatischen Erkrankungen auf, vor allem bei Systemischem Lupus Erythematoses. Fast alle SLE-Patienten sind ANA-positiv. Diese diagnostische Empfindlichkeit führte zu einer Implementierung des ANA-Tests in die 1982 von einem Subkomitee des American College of Rheumatology überarbeiteten Kriterien für die Klassifizierung von Systemischem Lupus Erythematoses.² Auch wenn der ANA-Test ein ausgezeichneter Screening-Test für SLE ist (ein negatives Ergebnis schließt aktives SLE praktisch aus³), ist er keineswegs ein spezifischer Test. Patienten mit anderen Bindegewebserkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Sklerodermie und Dermatomyositis sind häufig ebenfalls ANA positiv. Außerdem lassen sich niedrige ANA-Titer unter Umständen auch in anderen Krankheitsstadien und in der normalen Population nachweisen. Positive ANA-Ergebnisse können nach schweren Verbrennungen oder Virusinfektionen auftreten und wurden ebenfalls für gesunde, vorzugsweise ältere Personen beschrieben. Aufgrund dieser mangelnden Spezifität wird empfohlen, alle ANA-positiven Proben bis zum Endpunkt zu titrieren und spezifischere Tests für Autoantikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) und extrahierbare nukleäre Antigen(ENA)-Autoantikörper durchzuführen.

Indirekte Immunfluoreszenz ist die Referenzmethode für den ANA-Test. Als Substrat werden meistens dünne Sektionen von Nagetierorganen oder verschiedene Zelllinien verwendet. Generell gilt, dass die neueren Zelllinien gegenüber Gewebeschnitten zu bevorzugen sind, da diese sich rapide teilenden Zellen höhere Konzentrationen von klinisch relevanten Antigenen, einschließlich Zentromer, SS-A (Ro), Scl-70 und PCNA/Cyclin, enthalten.

Neben der Art des Substrates sind drei weitere Faktoren wichtig für die Leistung eines ANA-Tests: 1) das zur Präparation des Objektträgers verwendete Fixiermittel, 2) das Verhältnis von Fluoreszein und Protein (F/P) und 3) die Immunglobulin-Subklassenspezifität des Konjugats. Es ist bekannt, dass einige Fixiermittel oder Kombinationen davon bestimmte nukleäre Antigene zerstören. Die Verwendung dieser Fixiermittel sollte vermieden werden. Die Sensitivität und nicht-spezifische Hintergrundverfärbung eines Konjugats hängt vom F/P-Verhältnis ab, während die Krankheitsspezifität eines Konjugats durch die Immunglobulin-Subklassenreaktivität bestimmt wird. Praktisch alle klinisch signifikanten Autoantikörper weisen IgG-Subklassenspezifität auf, sogar in Gegenwart von IgM- und IgA-spezifischen ANA.⁴ Dagegen gehören die in gesunden Blutspendern gefundenen ANA generell nur der IgM- und IgA-Subklasse an.⁵ Deshalb sind IgG-spezifische Konjugate krankheitsspezifischer. Für NOVA Lite™ HEp-2 wurde deshalb als Substrat eine optimal fixierte humane Epithelzelllinie (HEp-2) und ein affinitätsgereinigtes Antihuman-IgG Konjugat mit sorgfältig ausgewähltem F/P-Verhältnis ausgewählt.

Die ausgezeichnete Abstimmung aller Testparameter des NOVA Lite™ HEp-2-Tests gewährleistet den Nachweis aller klinisch relevanten Autoantikörper inklusive SS-A und Scl-70, die von einigen anderen handelsüblichen ANA-Tests nicht erfasst werden. Zusätzlich wird durch die Spezifität des IgG-Konjugats die Möglichkeit von physiologisch falsch positiven Ergebnissen, die aufgrund niedriger Titer für IgM-Autoantikörper auftreten und oft in älteren, jedoch gesunden Menschen vorkommen, eliminiert.

Testprinzip

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmethode werden die Proben mit Antigensubstrat inkubiert und anschliessend ungebundene Antikörper ausgewaschen. Das Substrat wird nun mit einem spezifischen Fluoreszein-markierten Konjugat inkubiert und danach wird ungebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Bei der Betrachtung durch ein Fluoreszenzmikroskop sind Autoantikörper-positive Proben durch eine apfelgrüne Fluoreszenz zu erkennen, die den Bereichen der Zelle oder des Zellkerns entspricht, an den der Autoantikörper gebunden ist.

Inhalt der Testpackung

1. HEp-2 (menschliche Epithelzelle) Substrat-Objektträger; 12 Auftragsstellen, mit Trockenmittel
2. Antihuman-IgG-Konjugat (Ziege), Fluoreszeinmarkierung in einem Puffer, der Evans Blue und 0,09% Natriumazid enthält, 4 ml
3. Titrierbare ANA-Endpunktkontrolle, 1 Fläschchen Puffer mit 0,09% Natriumazid und Humanserum-Antikörpern gegen HEp-2, vorverdünnt, 0,5 ml
4. Autoantikörper Negativkontrolle, 1 Fläschchen Puffer mit 0,09% Natriumazid ohne Humanserum-Antikörper gegen HEp-2, vorverdünnt, 0,5 ml
5. PBS-Konzentrat (40x), ergibt 1000 ml
6. Mounting Medium, 0,09% Natriumazid, 7 ml
7. Deckgläser

Hinweise

1. Alle in diesem Test verwendeten Reagenzien wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.⁶
2. NaN_3 wird als Stabilisator verwendet. NaN_3 ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
3. Während der Arbeit mit den Reagenzien die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung tragen.
4. Verschüttete Reagenzien sofort beseitigen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle Umweltvorschriften beachten.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieser Test ist für "In-Vitro Diagnostik".
2. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Unvollständiges Waschen und ungenügendes Entfernen der Flüssigkeiten aus den IFA Kavitäten führt zu hohen Hintergrund-Extinktionen.
4. Die Applikation sowohl des ganzen Tests als auch einzelner Bestandteile auf nicht validierte automatische Analysensysteme oder Pipettierautomaten kann gegenüber der manuellen Testdurchführung zu abweichenden Testergebnissen führen. Es liegt in der Verantwortlichkeit jedes Labors ihr automatisiertes Verfahren zu validieren, so daß die Testergebnisse innerhalb akzeptabler Grenzen liegen.
5. Die Testqualität wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Diese beinhalten die Temperatur der Reagenzien, die Stärke der benutzten Mikroskoplichtquelle, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Pipettiertechnik, die Gründlichkeit des Waschens und die Länge der Inkubationszeiten während des Tests. Um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muß die Konstanz dieser Faktoren besonders beachtet werden.
6. Im Laufe der Zeit kann das Anti-human IgG-Konjugat durch Lichteinfluß seine Farbe verändern. Dieser Farbwechsel hat jedoch keinerlei Einfluß auf die Testdurchführung und -qualität.
7. Die strikte Einhaltung des Testprotokolls wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.

Lagerung

1. Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
2. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C vier Woche stabil.

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Werden Azide oder andere Stabilisatoren zu den Serumproben gegeben, können die Ergebnisse nachteilig beeinflusst werden. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blut zu trennen. Das NCCLS Dokument H18-A2 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testdurchführung sorgfältig durchgemischt werden.

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- | | |
|---|---|
| 5 | HEp-2 SubstratObjektträger mit 12-Auftragsstellen |
| 1 | 4 ml FITC Antihuman-IgG-Konjugat |
| 1 | 0,5 ml Titrierbare ANA-Endpunktkontrolle |
| 1 | 0,5 ml Autoantikörper Negativkontrolle |
| 1 | 25 ml PBS-Konzentrat (40x) |
| 1 | 7 ml Mounting Medium |
| 1 | 10 Deckgläser |

Zusätzliches benötigtes Material

Pipetten für 15-1000 µl
Destilliertes oder deionisiertes Wasser
Spritzflaschen oder Pasteur-Pipetten
Feuchte Kammer
1L Gefäß zur PBS-Verdünnung
Küvette zum Waschen der Objektträger
Fluoreszenzmikroskop mit 495 nm Anregungsfilter und 515 nm Sperrfilter

Methode

Testvorbereitung

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) und gründlich mischen.
2. **Das PBS-Konzentrat verdünnen:** WICHTIG: Zum Verdünnen des PBS-Konzentrats im Verhältnis 1:40 den Inhalt der PBS-Konzentratflasche in 975 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser geben und gut mischen. Der PBS-Puffer wird zum Verdünnen der Patientenproben und als Waschpuffer verwendet. Der verdünnte Puffer kann maximal 4 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.
3. **Die Patientenproben verdünnen:**
 - a. Erstes Screening: Die Patientenproben im Verhältnis 1:40 mit verdünntem PBS-Puffer verdünnen (d.h., 50 µl Serum in 1,95 ml PBS-Puffer geben).
 - b. Titrierung: Aus der ersten Screening-Verdünnung eine 2-fach Serienverdünnungsreihe für alle positiven Proben mit verdünntem PBS-Puffer herstellen (d.h. 1:80, 1:160,... 1:2560).

Testdurchführung

1. **Die Substrat-Objektträger vorbereiten:** Den Objektträger erst aus der Packung nehmen, wenn dieser Raumtemperatur erreicht hat. Den Objektträger mit einem Bleistift beschriften und in eine feuchte Kammer legen. Einen Tropfen (20-25 µl) der unverdünnten positiven und der negativen Kontrolle jeweils auf die Auftragsstellen 1 und 2 geben. Einen Tropfen (20-25 µl) der verdünnten Patientenprobe auf die restlichen Auftragsstellen geben.
2. **Inkubation des Objektträgers:** Den Objektträger 30 ± 5 Minuten lang in einer feuchten Kammer inkubieren (zur Aufrechterhaltung der richtigen Feuchtigkeit ein feuchtes Papiertuch flach auf den Boden eines geschlossenen Plastik- oder Glasbehälters legen). **Das Substrat darf während der Testdurchführung nicht austrocknen.**
3. **Objektträger waschen:** Nach der Inkubation das Serum unter Verwendung einer Spritzflasche oder Pipette vorsichtig mit verdünntem PBS-Puffer abwaschen. Zur Vermeidung eines carry-over sollte der Objektträger so gehalten werden, dass kein Serum auf andere Auftragsstellen gelangt. **Den Strahl nicht direkt auf die Auftragsstellen richten, um eine Beschädigung des Substrats zu vermeiden.** Wenn Sie gewünscht werden, legen Sie des Objektträgers in ein Coplin Glas des verdünnten PBS Puffers für bis 5 Minuten.
4. **Zugabe des Fluoreszenzkonjugats:** Überschüssigen PBS-Puffer ablaufen lassen. Den Objektträger wieder in die feuchte Kammer legen und **sofort** alle Auftragsstellen mit einem Tropfen des Fluoreszenzkonjugats bedecken. Den Objektträger weitere 30 ± 5 Minuten inkubieren.
5. **Objektträger waschen:** Schritt 3 wiederholen.
6. **Eindecken :** Obwohl jedes Labor seine eigene Methode zum Eindecken von Objektträgern hat, wird das folgende Vorgehen empfohlen:
 - a. Objektträger auf ein Papiertuch legen.
 - b. Das Mounting Medium in einer durchgehenden Linie auf den unteren Rand des Deckgläschens auftragen.
 - c. Überschüssigen PBS-Puffer absaugen. Deckglas mit der unteren Kante zuerst auf den Objektträger auflegen und langsam auf den Objektträger absenken, so dass keine Luftblasen entstehen.

Qualitätskontrolle

Die titrierbare ANA-Endpunktkontrolle und die Autoantikörper Negativkontrolle sollten auf jedem Objektträger durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Arbeitsschritte richtig ausgeführt wurden. Weitere geeignete Kontrollseren können durch Aliquotieren von gepoolten Humanserumproben hergestellt und bei $\leq -70^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Testergebnisse können erst als gültig akzeptiert werden, wenn alle der unten aufgeführten Kriterien erfüllt sind. Wenn eine dieser Kriterien nicht erfüllt ist, sollten die Testergebnisse als ungültig angesehen und der Test wiederholt werden.

1. Die unverdünnte titrierbare ANA-Endpunktkontrolle muss $\geq 3+$ sein.
2. Die Autoantikörper Negativkontrolle muss negativ sein.

Interpretation der Ergebnisse

Negative Reaktion. Eine Probe ist negativ, wenn die spezifische Verfärbung gleich oder weniger als die Autoantikörper Negativkontrolle ist. Proben können aufgrund heterophiler Antikörper oder niedriger Konzentrationen von Autoantikörpern gegen zytoplasmische Bestandteile, wie kontraktile Proteine, unterschiedliche Konzentrationen der Hintergrundverfärbung aufweisen.

Positive Reaktion. Eine Probe ist positiv, wenn die spezifische Fluoreszenzfärbung stärker als die Autoantikörper Negativkontrolle ist.

Zur Bestimmung des Fluoreszenzgrads bzw. der Intensität sind folgende Kriterien anzuwenden:

- 4+ Grelle apfelgrüne Fluoreszenz
- 3+ Helle apfelgrüne Fluoreszenz
- 2+ Deutlich erkennbare positive Fluoreszenz
- 1+ Niedrigste spezifische Fluoreszenz, die eine deutliche Differenzierung der nukleären und/oder zytoplasmischen Verfärbung von der Hintergrundfluoreszenz ermöglicht.

Musterinterpretation. Je nach den Arten und relativen Mengen der in der Probe vorhandenen Autoantikörper können viele verschiedene Muster der nukleären und/oder zytoplasmischen Verfärbung auftreten. Folgende Arten von Fluoreszenzmustern können beobachtet werden:

Homogen: Gleichmäßige Fluoreszenz des Zellkerns mit oder ohne Maskierung der Kernkörperchen.

Vorhandene nukleäre Antigene: dsDNA, ssDNA, Histone

Verbundene Krankheiten: Hohe Titer deuten SLE an; niedrige Titer deuten SLE oder andere

Bindegewebserkrankungen an.

Peripher: Diffuse Fluoreszenz, stärker im Randzonenbereich des Zellkerns, schwächer im Zentrum des Zellkerns.

Vorhandene nukleäre Antigene: dsDNA, ssDNA, DNP, Histon

Assoziierte Krankheiten: Hohe Titer deuten SLE an; niedrige Titer deuten SLE oder andere Bindegewebserkrankungen an.

Gesprenkelt: Feine oder körnige Anfärbung des Zellkerns, generell ohne Fluoreszenzverfärbung der Kernkörperchen.

Vorhandene nukleäre Antigene: Sm, RNP, Scl-70, SS-A, SS-B und andere, noch nicht identifizierte Antigen-/Antikörpersysteme.

Assoziierte Krankheiten: Hohe Titer deuten auf SLE (Sm-Antikörper), verschiedene Bindegewebserkrankungen (RNP-Antikörper), Sklerodermie (Scl-70-Antikörper) oder Sjögren-Syndrom-Sicca-Komplex (SS-B-Antikörper) an; niedrige Titer weisen eventuell auf andere Bindegewebserkrankungen an.

Nukleolär: Große, grob gesprenkelte Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns, meistens weniger als 6 Sprenkel pro Zelle, mit oder ohne gelegentliche feine Sprenkel.

Vorhandene nukleäre Antigene: 4-6S RNA und andere unbekannte nukleäre Antigene.

Assoziierte Krankheiten: Hohe Titer treten vorrangig bei Sklerodermie und Sjögren-Syndrom auf.

Zentromer: Ein diskret gesprenkeltes Fluoreszenzmuster. Die nukleären Sprenkel sind sehr diskret und kommen gewöhnlich in einem Mehrfachen von 46 vor.

Vorhandene nukleäre Antigene: Chromosomale Zentromere (Kinetochor).

Assoziierte Krankheiten: Deutet stark auf ein CREST-Syndrom hin, eine Variante der progressiven systemischen Sklerose (PSS), CREST ist eine Form von PSS mit prominenter Kalzinose sowie Raynaud-Phänomen, Ösophagusdysmotilität und begrenzte Beteiligung der Haut (oft auf Finger und Gesicht beschränkt), Telangiektasie.

Mitochondrial: Diskrete Sprenkelung des Zytoplasmas mit relativer Verschonung des Kernbereichs.

Vorhandene Antigene: Verschiedene Arten von mitochondrialen Antigenen.

Assoziierte Krankheiten: Hohe Titer deuten eine primäre biliäre Zirrhose an.

Es ist wichtig, den Benutzer darauf hinzuweisen, dass man sich zur Bestimmung der Autoantikörper-Spezifität nicht auf die Muster verlassen kann, ausgenommen der nukleolären und zentromeren Muster, bei denen jedes Antigen sehr deutlich definiert ist und die Muster sehr charakteristisch sind. Da viele Autoantikörper oder Kombinationen davon ein homogenes oder gesprenkeltes Muster erzeugen können, wird empfohlen, bei allen gesprenkelten und homogenen Proben spezifische nachfassende Autoantikörpertests durchzuführen (z.B. für dsDNA und ENA).

Grenzen des Verfahrens

1. Ein hoher ANA-Titer deutet eine Bindegewebserkrankung an, sollte aber nicht als Diagnose verwendet werden. Das ANA-Ergebnis sollte in Verbindung mit anderen serologischen Ergebnissen und der allgemeinen klinischen Anamnese des Patienten beurteilt werden.
2. ANA-Muster ändern sich oft, wenn die Probe bis zum Endpunkt titriert wird. Der Grund dafür ist, dass die niedrigen Titerantikörper bei stärker verdünnten Proben letztendlich die Sensitivität des Systems unterschreiten.
3. Auch eine Reihe von externen Faktoren beeinflusst die Testsensitivität, u.a. die Art des verwendeten Fluoreszenzmikroskops, Stärke und Alter der Lichtquelle, verwendete Vergrößerung, Filtersystem und Erfahrung des Benutzers.
4. Wenn anstelle des 515-Sperrfilters ein Breitbandfilter verwendet wird, tritt eventuell eine verstärkte Artefaktbildung auf.
5. Zur Beschriftung der Objektträger sollte ausschließlich ein Bleistift verwendet werden. Bei Verwendung anderer Schreibutensilien können Artefakte entstehen.
6. Alle zum Waschen der Objektträger verwendeten Waschküvetten müssen frei von jeglichen Farbstoffrückständen sein. Wenn in den Waschküvetten Farbrückstände sind, besteht die Gefahr von Artefaktbildungen.
7. Die ermittelten Testergebnisse sollten ausschließlich in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.
8. Der vorliegende Test wurde ausschließlich für die Untersuchung von Serum konzipiert.

Erwartungswerte

Mit dem NOVA Lite™ HEp-2 Test wurden eine Vielzahl von Patienten mit Bindegewebserkrankungen und 200 zufällig ausgewählte Blutspender getestet und die folgenden Ergebnisse ermittelt:

Patientengruppe	Anzahl	NOVA Lite™ HEp-2 Anzahl Positiv
SLE	105	101
Medikamenten-induzierter Lupus	24	24
Rheumatoide Arthritis	40	28
Sklerodermie	24	18
Dermatomyositis	14	10
Sjögren-Syndrom	14	12
Normal	200	5

Referenzen

1. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* **33**: 167-239, 1982.
2. Tan EM, et al.: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25**: 1271-1277, 1982.
3. Casalo SP, Friou GJ and Myers LL: Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **7**: 379-390, 1964.
4. Gonzalez E and Rothfield N: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* **274**: 1333-1338, 1966.
5. Wiik A: Antinuclear factors in sera from healthy blood donors. *Acta Path Microbiology Scand.* **84**: 215-220, 1976.
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, Fourth Edition, 1999 (HHS Pub. #(CDC) 93-8395).

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
628101

888-545-9495
November 2007
Revision DEU16

