



ANCA TESTSYSTEM

Nur zur in vitro-Diagnostik
Für Professionellen Gebrauch

INDIKATION: Dies ist ein indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest für den semiquantitativen Nachweis von antineutrophilen Zytoplasma-Antikörpern (ANCA) in humanem Serum. Der Test dient als Hilfestellung beim Nachweis von Antikörpern, die mit Autoimmun-Vaskulitis in Zusammenhang gebracht werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Antineutrophile Zytoplasma-Autoantikörper (ANCA) zählen zu einer Gruppe von Antikörpern, die mit Zytoplasma-Antigenen in Human-Neutrophilen reagieren. Obwohl über diese Antikörper bereits 1964 berichtet wurde (1), wurde eine Verbindung zu Krankheiten erst 1982 hergestellt, als Davies et al über die Antikörper bei acht Patienten mit segmentaler nekrotisierender Glomerulonephritis berichteten (2). 1984 wurde über vier weitere Patienten mit Vaskulitis und Glomerulonephritis berichtet. 1985 wiesen van der Woude et al den starken Zusammenhang zwischen ANCA und Wegener-Granulomatose nach und zeigten die Korrelation der Krankheitsaktivität mit der Antikörpertitrierung auf (3). 1988 berichteten Falk und Jennette, dass ANCA mehr als eine Antigen-Spezifität aufweisen (4). Eine nachfolgende Untersuchung hat gezeigt, dass die Spezifität von ANCA mit den pathologischen Ausprägungen von Vaskulitiden korreliert (5).

Im Immunofluoreszenz-Test für ANCA sind verschiedene Muster der Zellverfärbung zu sehen. Zwei wesentliche Verfärbungsmuster und deren Eigenschaften wurden beschrieben; dazu wurden im Immunofluoreszenz-ANCA-Test Äthanol-fixierte Neutrophile verwendet. Autoantikörper, die ein feines Granularmuster des Zytoplasma aufweisen, werden C-ANCA genannt und sind im Allgemeinen gegen eine Serin-Protease, Proteinase 3 (PR3), gerichtet. Diese Autoantikörper wiesen einen starken Zusammenhang mit Wegener-Granulomatose auf. Das andere wichtige Verfärbungsmuster, das perinukleäre bzw. P-ANCA-Muster, das in der Regel auf gegen Myeloperoxidase (MPO) gerichtete Antikörper zurückzuführen ist, wurde mit systemischer Vaskulitis und idiopathischer nekrotisierender und anwachsender Glomerulonephritis in Zusammenhang gebracht (4). Bei dem P-ANCA-Muster handelt es sich um einen Artfakt, hervorgerufen durch die Verwendung von Äthanol als Fixativ (4). Wenn die Neutrophile in Formalin fixiert sind, bleibt die Verbindung zwischen Myeloperoxidase (das für das P-ANCA-Muster in Äthanol-fixierten Zellen hauptverantwortliche Antigen) und den primären (alpha) Granularen, die durch eine Granularverteilung des Zytoplasma gekennzeichnet ist. Proteinase 3 (PR3) bleibt mit den primären (alpha) Granularen in Äthanol- und Formalin-Fixativen verbunden.

TESTPRINZIP

Das antineutrophile Zytoplasma-Autoantikörper Testsystem (ANCA) von Immuno Concepts arbeitet mit der Methode der indirekten Fluoreszenz-Antikörper (IFA), wie sie von Weller und Coons zuerst beschrieben wurde (6). Verdünnte Patientenproben werden mit Human-Neutrophilen verdünnt, die auf Glas oder Mikroskop-Objektträgern fixiert sind, um spezifische Bindungen von ANCA zu ermöglichen. Falls ANCA vorhanden sind, werden die Autoantikörper an neutrophile Antigene gebunden. Nach dem Waschen, bei dem nicht-spezifische Antikörper entfernt werden, wird das Substrat mit einem anti-Human-IgG, das an Fluoreszein konjugiert ist, inkubiert. Bei positivem Ergebnis bildet sich ein stabiler dreiteiliger Komplex, bestehend aus an humane ANCA gebundenen anti-Human-Fluoreszenz-Antikörpern, welche ihrerseits an Antigen in den Zellen gebunden sind. Dieser Komplex kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops

sichtbar gemacht werden. Für C-ANCA positive Proben weisen eine deutliche Granular-Zytoplasmaverfärbung der Neutrophile auf Äthanol- und Formalin-fixierten Objektträgern auf. In für P-ANCA positiven Proben ist eine diffuse oder periphere Zellkernverfärbung des Neutrophils auf Äthanol-fixierten Zellen zu sehen und auf Formalin-fixierten Zellen ist eine Granularverfärbung des Zytoplasma zu sehen. Wenn die Probe für ANCA negativ ist, zeigen die Neutrophile keine spezifische Verfärbung.

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 Behältern mit Schraubverschluss bei 2-10°C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden, bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen auftreten.

Stabilität: Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.

REAKTIVE REAGENZIEN

ANCA Substratträger:** Objektträger für Vertiefungen, die Human-Neutrophile enthalten, welche direkt auf den Testvertiefungen fixiert sind. 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. Wenn der Beutel beim Herausnehmen des Objektträgers aus dem Kit nicht aufgepumpt ist, ist der Beutel beschädigt und sollte nicht verwendet werden.

ANCA Probenverdünner: Katalognummer 10100 (100 ml). Spezieller gepufferter Probenverdünner zur Verdünnung der Patientenproben.

C-ANCA Positivkontrolle: Katalognummer 10021-12. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem C-ANCA Human-Kontrollserum. Dieses Serum weist eine Granularfärbung des Zytoplasma zwischen den Zellsegmenten des Neutrophils auf Äthanol- und auf Formalin-fixierten Objektträgern auf.

P-ANCA Positivkontrolle: Katalognummer 10021-11. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem P-ANCA Human-Kontrollserum. Dieses Serum weist eine diffuse oder periphere Zellkernverfärbung des Neutrophils auf Äthanol-fixierten Objektträgern auf und eine Granular-Fluoreszenz des Zytoplasma auf Formalin-fixierten Objektträgern.

C-ANCA Titrierbare Kontrolle: Katalognummer 10026-12. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 0,25 ml positivem C-ANCA Human-Kontrollserum in flüssiger stabiler Form. Diese Kontrolle ist als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln. Siehe Etikett für mittleren Titrierungsbereich.

P-ANCA Titrierbare Kontrolle: Katalognummer 10026-11. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 0,25 ml positivem P-ANCA Human-Kontrollserum in flüssiger stabiler Form. Diese Kontrolle ist als unverdünnte Patientenprobe zu behandeln. Siehe Etikett für mittleren Titrierungsbereich.

Negativkontrolle: Katalognummer 10031. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml negativem ANCA Human-Kontrollserum. Dieses Serum weist eine wenig ausgeprägte, nichtspezifische mattgrüne Fluoreszenz der Neutrophile auf.

Fluoreszenz-Antikörper-Reagens - spezifisch für IgG: Katalognummer 10009 (9ml). Anti-Human-IgG (Ziege), an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Dieses Reagens enthält Evans Blau als Gegenfärbung. Das Reagens wird gebrauchsfertig in Präzisionstropffläschchen geliefert.

***Dieser Objektträger ist durch mindestens eines der folgenden US- und anderen Patente geschützt: 4387972, D-274261, D-273261, Patent 1171302 in Kanada, andere Patente angemeldet.*

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

PBS-Puffer: 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 Pulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen und gekühlt bei 2-10°C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind.

Semipermanentes Eindeckmedium: Katalognummer 1111. Gebrauchsfertiges Tropf-Fläschchen mit 5 ml Glycerol-basiertem Montagemedium.

Deckgläser: Katalognummer 1041. Jede Packung enthält zehn Deckgläser 24x60 mm Nr. 1.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 20-25 µl
Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen
Spritzflasche oder Pasteur-Pipetten
Serologische Pipetten
Mehrere 1-Liter-Behälter (für PBS-Waschpuffer)
Deionisiertes oder destilliertes Wasser
Teströhrchen zur Herstellung von optionalen Reihenverdünnungen
Saugpapier oder Papierhandtücher
Inkubationskammer
Einmalhandschuhe
Laborstoppuhr
Fluoreszenz-Mikroskop mit 495 nm Erregerfilter und 515 nm Sperrfilter

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche zur Herstellung von Kontrollseren für dieses 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 HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kontrollseren 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. 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.
7. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
8. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
9. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
10. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
11. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
12. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Objektträger und Proben auf Zimmertemperatur (18-24 °C) gebracht werden.

13. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
14. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
15. 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 Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Raumtemperatur (18-24°C) gerinnen lassen. Das Serum muss so bald wie möglich abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobewachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil bei positiven Proben eine Abnahme der Antikörper-Titrierungen auftreten könnte. Proben mit hohen Lipidanteilen können einen nicht-spezifischen fluoreszenten Film über dem Zellsubstrat bilden. Die Verwendung von Fixierungs- oder Reinigungsproben durch Ultrazentrifugieren kann dieses Problem beheben. 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 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

In den für die Qualitätssicherung vorgesehenen Vertiefungen sollten für jeden Objektträger Positiv-, Negativ- und Leer-Kontrollläufe durchgeführt werden. Die C-ANCA Positivkontrolle sollte zwischen den Kernsegmenten auf Äthanol- oder Formalin-fixierten Objektträgern eine helle apfelgrüne fluoreszierende Granular-Zytoplasmaverfärbung im Neutrophil aufweisen. Die P-ANCA Positivkontrolle sollte eine helle apfelgrüne diffuse oder periphere Zellkernverfärbung des Neutrophils auf Äthanol-fixierten Objektträgern aufweisen und eine Granular-Fluoreszenz des Zytoplasma auf Formalin-fixierten Objektträgern. Die Negativkontrolle sollte keine hellgrüne Fluoreszenz aufweisen. In der Negativkontrolle ist u.U. eine nicht-spezifische mattgrüne Fluoreszenz von geringer Intensität festzustellen. Die leere Kontrollvertiefung wird zur Beobachtung nicht-spezifischer Verfärbungen durch das Antikörper-Reagens verwendet und sollte keine grüne Fluoreszenz aufweisen. Die Gegenfärbung des Konjugats kann eine mattrote Verfärbung der Zellen hervorrufen. Wenn die Kontrollvertiefungen nicht die beschriebenen Merkmale aufweisen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

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 1:20-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Zytoplasma sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

In unserem Labor wurde die mittlere Titrierung und 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 ANCA-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 ANCA-Fluoreszenz-Testsystems 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.

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. Unterdrückungsfilter: Mit Unterdrückungsfiltern 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

Zum Betrachten der Neutrophile wird eine 400-fache Vergrößerung empfohlen.

Negative Reaktion: Ein Serum ist als negativ für Antikörper gegen ANCA zu werten, wenn bei einer Verdünnung von 1:20 die Zell-Fluoreszenz geringer als oder gleich der negativen Kontrollvertiefung ist. In den Neutrophilen ist u.U. eine nicht-spezifische Hintergrundverfärbung, bedingt durch heterophile Antikörper oder Autoantikörper, zu beobachten.

Positive Reaktion: Ein Serum ist als positiv für ANCA zu werten, wenn bei einer Verdünnung von 1:20 die Zellen in jedem Feld eine Granular-Fluoreszenz des Zytoplasma aufweisen, die der C-ANCA-Kontrolle auf Äthanol- oder Formalin-fixierten Objektträgern ähnelt. Alternativ ist ein Serum als positiv für ANCA zu werten, wenn bei einer Verdünnung von 1:20 die Zellen eine diffuse oder periphere Zellkern-Fluoreszenz aufweisen, die der P-ANCA-Kontrolle auf Äthanol-fixierten Objektträgern ähnelt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Screening: Die Ergebnisse des Tests sind als positiv oder negativ bei 1:20-Verdünnung anzugeben.

Verfärbungsmuster: Zahlreiche Autoantikörper können eine Verfärbung des Zytoplasma und/oder des Neutrophil-Nukleus hervorrufen. Es treten hauptsächlich zwei spezifische Verfärbungsmuster auf:

C-ANCA (klassische oder Zytoplasma-Verfärbung): Die Verfärbung der Alpha- (primären) Granulare im Zytoplasma weist ein konsistentes, fleckiges Verfärbungsmuster des Zytoplasma auf, oft mit einer Konzentration der Verfärbung zwischen den Lappen des Nukleus. Die Flecken des Zytoplasma sind auf Äthanol- oder Formalin-fixierten Neutrophilen zu sehen.

P-ANCA (perinukleäre Verfärbung): Glatte oder homogene Verfärbung des mehrlappigen Nukleus, oft mit deutlicher peripherer Verfärbung der Nukleus-Lappen auf Äthanol-fixierten Neutrophilen. Auf Formalin-fixierten Neutrophilen weisen diese Antikörper eine Granularfärbung des Zytoplasma auf.

Antinukleäre und andere Autoantikörper können mit den Neutrophilen reagieren; es sollten deshalb alle positiven Proben mit einem HEP-2 Zellsubstrat auf ANA getestet werden, bevor das Ergebnis als Vorhandensein von ANCA gewertet wird.

Optionale Titrierung: Die Ergebnisse sind als reziprok zur Verdünnung der letzten Vertiefung, in der eine deutliche positive Reaktion sichtbar ist, anzugeben.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises antineutrophiler Zytoplasma-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 antineutrophile Zytoplasma-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. In Patientenproben vorhandene antinukleäre Antikörper können mit dem Zellsubstrat reagieren. Wenn antinukleäre Antikörper vorhanden sind, können die ANCA-Ergebnisse oft aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften der spezifischen ANCA-Verfärbung, unterschiedlicher Titrierungen und/oder Reaktionsintensität interpretiert werden. Falls die Fluoreszenz-Reaktion antinukleärer Antikörper so stark ist, dass die ANCA-Verfärbung überdeckt wird, sollte der Test als „nicht interpretierbar“ gewertet und eine alternative Methode zur Bestimmung des ANCA-Status des Patienten gewählt werden.
4. 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.
5. Um den klinischen Zustand des Patienten zu bestimmen, sollten die Ergebnisse des Tests im Zusammenhang mit den übrigen verfügbaren Informationen zur klinischen Einschätzung und anderen diagnostischen Methoden interpretiert werden.

ZU ERWARTENDE WERTE

Der zu erwartende Wert in der normalen Population ist negativ bei einer Screening-Verdünnung von 1:20. Bei Patienten mit vorhandenen Erkrankungen ergaben sich Titrierungen von bis zu 1:640 (7).

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

NORMALE PROBEN

Serumproben von 497 Blutspendern (247 Männer und 250 Frauen) wurden parallel mit dem Immuno Concepts ANCA Kit und einem anderen im Handel erhältlichen Kit getestet. Alle Proben dieser Population, die auf Äthanol-fixierten Objektträgern positiv waren, wurden außerdem mit dem HEP-2 ANA Testsystem von Immuno Concepts auf antinukleäre Antikörper (ANA) getestet.

Unter den normalen Proben waren 22 Proben, die für ANA positiv und als nicht interpretierbar für ANCA zu werten waren. Die übrigen Proben mit Diskrepanzen wurden auf Antikörper gegen MPO und PR3 mithilfe der ELISA-Tests zur Bestimmung des tatsächlichen Antikörper-Status getestet.

SEREN, DIE ZUVOR DURCH INDIREKTE IMMUNOFLUORESCENZ ALS POSITIV FÜR ANCA BESTIMMT WURDEN

Serumproben, die mithilfe haus eigener IFA-Assays als positiv für ANCA gewertet wurden, wurden von Referenzlabors in den USA, Großbritannien und Australien bezogen. Insgesamt wurden 383 Seren, die als positiv für ANCA eingeschätzt wurden, in diesem Teil der Studie überprüft. Diese Serumproben wurden parallel mit dem Immuno Concepts ANCA Kit und einem anderen im Handel erhältlichen Kit getestet. Proben mit Diskrepanzen wurden mithilfe des HEP-2 ANA Testsystems von Immuno Concepts auf ANA und mithilfe der ELISA-Tests auf Antikörper gegen MPO und PR3 getestet.

Durch Kombination der Testergebnisse der normalen und der anormalen Population erhielten wir im ersten Vergleich für das ANCA Testsystem von Immuno Concepts mit Äthanol-fixierten Human-Neutrophilen (Tabelle 1) die folgenden Daten:

		Vergleichsmethode	
		Positiv	Negativ
IC Äthanol ANCA	Positiv	324	94
	Negativ	124	316

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Vergleichswerte:

Relative Sensitivität: 72,3%

Relative Spezifität: 77,1%

Übereinstimmung insgesamt: 74,6%

Im ersten Vergleich für das ANCA Testsystem von Immuno Concepts mit Formalin-fixierten Human-Neutrophilen erhielten wir die folgenden Daten (Tabelle 2):

		Vergleichsmethode	
		Positiv	Negativ
IC Formalin ANCA	Positiv	255	52
	Negativ	45	528

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Vergleichswerte:

Relative Sensitivität: 85,0%

Relative Spezifität: 91,0%

Übereinstimmung insgesamt: 89,0%

Im Gegensatz zu den mit Autoimmun-Vaskulitis in Verbindung gebrachten Antikörpern, können zahlreiche Autoantikörper mit Human-Neutrophilen reagieren (8). Zur Bestätigung, dass die durch einen ANCA Immunofluoreszenztest nachgewiesenen Antikörper klinisch signifikant sind, werden zusätzliche Tests mit ELISA Assays auf Myeloperoxidase (MPO) und Proteinase 3 (PR3) dringend empfohlen (9).

Alle Proben in obigen Tabellen, die Diskrepanzen aufwiesen, wurden auf antinukleäre Antikörper und auf Antikörper gegen MPO und PR3 getestet. Tabelle 3 enthält die Ergebnisse für das ANCA-Testsystem von Immuno Concepts mit Äthanol-fixierten Human-Neutrophilen, unter Einbeziehung der Ergebnisse aus diesen Tests:

		Vergleichsmethode	
		Positiv	Negativ
IC Äthanol ANCA	Positiv	380	32
	Negativ	6	434

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Vergleichswerte:

Relative Sensitivität: 98,4%

Relative Spezifität: 93,1%

Übereinstimmung insgesamt: 95,5%

Die Endergebnisse für das ANCA Testsystem von Immuno Concepts mit Formalin-fixierten Human-Neutrophilen sind in Tabelle 4 enthalten:

		Vergleichsmethode	
		Positiv	Negativ
IC Formalin ANCA	Positiv	292	13
	Negativ	5	548

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Vergleichswerte:

Relative Sensitivität: 98,3%

Relative Spezifität: 97,7%

Übereinstimmung insgesamt: 98,6%

SERUMPROBEN VON PATIENTEN MIT BEKANNTER VASKULITIS

Proben von 102 Patienten mit klinisch erfassten Vaskulitiden wurden mit den Äthanol-fixierten Neutrophilen von Immuno Concepts und den Formalin-fixierten Neutrophilen von Immuno Concepts getestet. Die Ergebnisse dieses Vergleichs finden sich in Tabelle 5:

Tabelle 5

Klinische Diagnose	Zahl	Positiv	Verfärbungsmuster (Äthanol-fixiert)
Wegener-Granulomatose	30	26 (86,7%)	alla C-ANCA
Kussmaul'sche Krankheit	12	8 (66,7%)	alla P-ANCA
Mikroskopische Polyarteriitis	20	18 (90,0%)	alla P-ANCA
Churg-Strauss Syndrom	3	2 (66,7%)	einmal P-ANCA; einmal P-ANCA und C-ANCA
Immunkomplex wachsende Glomerulonephritis	15	10 (66,7%)	alla P-ANCA
Entzündliche Darmerkrankung	22	17 (77,3%)	alla atypische P-ANCA

KREUZREAKTIVITÄT

Seren von 57 Patienten mit verschiedenen Autoimmunstörungen wurden mit dem ANCA Testsystem von Immuno Concepts mit Äthanol-fixierten Human-Neutrophilen und dem ANCA Testsystem von Immuno Concepts mit Formalin-fixierten Human-Neutrophilen getestet. Drei dieser Proben wiesen auf den Äthanol-fixierten Neutrophilen eine atypische Zellkernverfärbung auf, die an das P-ANCA Muster erinnerte. Alle drei Proben stammten von Patienten mit SLE, waren positiv für anti-DNA Antikörper und wiesen positive ANA mit einem homogenen Muster auf. Eine weitere Probe wies auf den Äthanol-fixierten Neutrophilen Flecken des Zytoplasma auf, auf den Formalin-fixierten Neutrophilen und im ANA-Test war sie jedoch negativ. Diese Probe wurde als nicht-spezifische Reaktion gewertet. Alle anderen Seren dieser Population waren auf den Äthanol- und Formalin-fixierten Neutrophilen negativ. Da zahlreiche Autoantikörper mit Human-Neutrophilen nicht-spezifisch reagieren können (8), sollten positive Immunofluoreszenz-Tests stets mithilfe spezifischer Assays für ANCA-assoziierte Antikörper bestätigt werden.

REPRODUZIERBARKEIT

Studien wurden in einem Durchlauf, an verschiedenen Tagen sowie chargenübergreifend durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des ANCA Testsystems von Immuno Concepts mit Äthanol-fixierten Human-Neutrophilen und mit Formalin-fixierten Human-Neutrophilen zu demonstrieren. Die in dieser Studie verwendeten Seren beinhalteten drei P-ANCA-positive Proben (von denen eine Probe eine starke, eine Probe eine moderate und eine Probe eine schwache Verfärbung aufwies) sowie drei C-ANCA-positive Proben (mit jeweils starken, moderaten oder schwachen Verfärbungen). Außerdem wurden sechs Proben verwendet, die für ANCA negativ waren. In der Studie mit einem Durchlauf wurden diese 12 Seren in Replikaten von jeweils sechs Vertiefungen getestet. Für die Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Chargen wurden diese 12 Seren jeweils an drei Chargennummern von Kits bei drei verschiedenen Gelegenheiten getestet. Die sechs negativen Proben waren auf allen getesteten Objektträgern negativ; die positiven Proben waren mit konsistenter Fluoreszenz-Intensität auf allen getesteten Objektträgern positiv.

BIBLIOGRAPHIE

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotizing Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318:1651-1657, 1988.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. 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.
7. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
8. Stroncek, D.F., et al. Neutrophil alloantibodies react with cytoplasmic antigens: A possible cause of false-positive indirect immunofluorescence assays for antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Am. J. Kidney Dis.* 21:368-373, 1993.
9. Proceedings of the ANCA & Vasculitis Symposium, Satellite Conference to the XIV International Congress of Nephrology, 30 May - 1 June 1997, Melbourne, Australia.

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



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9779 Business Park Drive Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: techservice@immunoconcepts.com

Cat 10060-11-I,

4.11.02.003.103-De

Rev 1.0 © Copyright 2007

IVD Directive (2001/59/EC) Danger Phrases



REF 1105: Evans Blau

R45	Kann Krebs erzeugen.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
S53	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

ANCA TESTVERFAHREN

- 1. PUFFER (PBS) REKONSTITUIEREN**
Inhalt eines Beutels mit Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Abdecken und bei 2-10°C bis zu vier Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind.
- 2. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN**
Screening: Patientenproben durch Zugabe von 0,05 ml (50 µl) Patientenserum zu 0,95 ml (950 µl) Probenverdünner 1:20 verdünnen.
Semiquantitative Titrierung: Zur Herstellung von zweifachen Reihenverdünnungen der Screening-Proben (z.B. 1:40, 1:80, 1:160...1:640), 0,5 ml von der 1:20 Verdünnung trennen und mit 0,5 ml Probenverdünnung mischen, um eine Verdünnung von 1:40 zu erzielen, anschließend auf diese Weise weitere Reihenverdünnungen herstellen.
- 3. VERDÜNNEN DES OPTIONALEN TITRIERBAREN KONTROLLSERUMS**
Die optionale titrierbare Kontrolle als unverdünnte Patientenprobe behandeln. Das Kontrollserum 1:20 verdünnen, indem 0,05 ml (50 µl) Kontrollserum zu 0,95 ml Probenverdünnung zugegeben werden. Zweifache Reihenverdünnungen des titrierbaren Kontrollserums wie oben beschrieben herstellen.
- 4. 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) verdünnter Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.
ACHTUNG: DIREKTER KONTAKT DER TROPFERSPITZE MIT DEM OBJEKTTRÄGER KANN DAS ANTIGEN-SUBSTRAT BESCHÄDIGEN.
- 5. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-24°C)**
Objektträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-24°C) abgedeckt inkubieren lassen.
- 6. 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 mit 10 Vertiefungen eine Kreuzkontamination zu vermeiden, den PBS auf die Mittellinie des Objektträgers spritzen, dabei den Träger zuerst in Richtung Vertiefungen 1-3 neigen, anschließend in Richtung Vertiefungen 4-6.
- 7. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)**
Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Dieser Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf bis zu 30 Minuten ausgedehnt werden. PBS-Waschlösung nach Gebrauch entsorgen.
- 8. FLUORESCENZ-ANTIKÖRPERREAGENS (Vertiefungen mit 10-12 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.
- 9. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Zimmertemperatur, 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 Zimmertemperatur (18-24°C) inkubieren lassen.
- 10. PBS-SPÜLUNG**
Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.
- 11. PBS-WASCHVORGANG (10 Minuten)**
Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Dieser Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf bis zu 30 Minuten ausgedehnt werden.
- 12. DECKGLAS AUFSETZEN**
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.
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 Lufternschlüsse 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.

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