



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

Gebrauchsinformation

**BIOGNOST® ANA NACHWEIS**

INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZTEST zum Nachweis von ANTINUKLEÄREN ANTIKÖRPERN (ANA) auf HEP-2 ZELLEN in humanem Serum

Testkit für 60 Bestimmungen, Best.Nr. AN-1060

Testkit für 120 Bestimmungen, Best.Nr. AN-1120

Alle Reagenzien der Testkits sind auch einzeln erhältlich

Testdauer: ca. 90 min

Beim ANA Nachweis auf HEP-2 Zellen werden die Seren zum Screenen 1:16 oder 1:10, zum Titrieren gemäß 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 etc. oder 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 etc. mit PBS Puffer verdünnt. *)

*) sofern die regionalen Referenzbereiche mit den von Bios® bestimmten Werten übereinstimmen (siehe Abschnitt Interpretation der Ergebnisse)

BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH

Der Biognost® ANA Nachweis ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung von antinukleären Antikörpern in humanem Serum. Der Biognost® ANA IFT ist zum Einsatz in der Diagnostik von verschiedenen Autoimmunerkrankungen bestimmt.

EINFÜHRUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, die mit verschiedenen Strukturen des Zellkerns reagieren. ANA kommen bei vielen systemischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen und bei Mischsyndromen dieser Krankheiten vor. Sie werden regelmäßig und meist in höheren Titern bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) gefunden. Wegen der hohen Korrelation (um 98%) macht ein negatives ANA Testergebnis diese Krankheit sehr unwahrscheinlich. Man vermutet, dass die meisten, wenn nicht sogar alle in der Literatur beschriebenen Fälle von ANA negativem SLE darauf zurückzuführen sind, dass die zum ANA Nachweis verwendeten Substrate nicht alle wichtigen ANA Antigene (z.B. SS-A) enthielten.

Weiterhin lassen sich antinukleäre Antikörper sehr oft (> 90%) bei Sjögren Syndrom, Mischkollagenose (MCTD), Sklerodermie einschließlich der Variante CREST-Syndrom und etwas seltener bei Polymyositis/ Dermatomyositis nachweisen. Auch bei rheumatoider Arthritis, chronisch aktiver Hepatitis, primärer biliärer Zirrhose (PBC) oder Myasthenia gravis u.a. werden noch relativ häufig antinukleäre Antikörper gefunden, je nach Erkrankung bei etwa 30-75% der Patienten. Für die Diagnose der „Systemisch autoimmun-rheumatischen Erkrankungen“ (Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases, SARD) sind die Antinukleären Antikörper (ANA) der Schlüssel-Marker. Außerdem kann eine Reihe von Medikamenten bei Langzeiteinnahme die Bildung von ANA auslösen. Wesentlich seltener werden dagegen durch diese Medikamente auch Lupus-ähnliche klinische Symptome induziert.

Aufgrund der großen Anzahl von Antigenstrukturen im Zellkern kann man mittlerweile (je nach Nomenklatur) mindestens 26 Antigen-Antikörper-Systeme mit pathologischer Bedeutung unterscheiden, die sich neben ihrer biochemischen Struktur vor allem in ihrer diagnostischen Wertigkeit und ihrer Häufigkeit unterscheiden. Allerdings dürften damit bei weitem noch nicht alle relevanten Kernantigene (Autoantigene) erfasst sein. Auch dürfte die Summe der Einzelreaktionen nicht identisch mit der Gesamtreaktion am nativen Kern sein, da sich die molekularen Konfigurationen der Autoantigene im Zellkern gegenseitig beeinflussen und so Epitope geschaffen werden, die auf den isolierten Kernbestandteilen fehlen.

Besonders häufig werden antinukleäre Antikörper gegen Histone, Chromatin, native DNA, nRNP, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl 70 usw. nachgewiesen. Selten tritt nur ein einzelner ANA-Subtyp auf. Eine genaue Differenzierung der verschiedenen ANA-Typen bzw. der entsprechenden Fluoreszenzmuster ist mit der Immunfluoreszenzmethode jedoch nicht möglich. Auf HEP-2 Zellen unterscheidet man lediglich die Fluoreszenzmuster ANA "homogen", "gesprenkelt", "nukleolar", "centromer" und "nuclear dots"; die Übergänge zwischen diesen Fluoreszenzmustern sind allerdings fließend und oft auch vom Verdünnungsgrad der Seren abhängig. Als Teststrategie für die ANA Diagnostik wird deshalb allgemein empfohlen, zuerst einen sensitiven und kostengünstigen Screening-Test durchzuführen, welcher alle klinisch relevanten nukleären Autoantigene enthält. Diese Bedingungen werden von dem hier beschriebenen Biognost® ANA IFT auf HEP-2 Zellen erfüllt.

Nach wie vor ist der Nachweis von ANA auf Hep-2 Zellen mittels der Indirekten Immunfluoreszenztechnik (IIF, IFT) einerseits der „Goldstandard“ für diesen Antikörper Nachweis und andererseits ist diese Methode ebenfalls die meist angewandte Methode in der Laborroutine für diesen Antikörpernachweis. Dieses ist vorteilhaft für die Signifikanz und für die Vergleichbarkeit der Testergebnisse.

Vorteile des ANA Nachweises auf HEP-2 Zellen gegenüber dem früher üblichen Nachweis auf Rattenleber:

1. Hep-2 Zellen sind im Durchschnitt etwas sensitiver als Rattenleber, d.h. der Titer vieler Seren liegt auf HEP-2 Zellen um 1-2 Stufen höher als auf Rattenleber.
2. Sie stellen eine humane Zelllinie dar.
3. Hep-2 Zellen besitzen größere Kerne als Rattenleberzellen, so dass die Kernstrukturen und damit die ANA Fluoreszenzmuster darauf etwas deutlicher zu erkennen sind als auf Rattenleber.
4. Sofern bei der Kultivierung der Zellen optimale Bedingungen eingehalten wurden, sind Antikörper gegen SS-A (Ro) und SS-B (La) auf HEP-2 Zellen nachweisbar, was für die HEP-2 Zellen im vorliegenden Biognost® ANA IFT zutrifft. Auf Rattenleber gelingt der Nachweis von gegen diese beiden Antigene gerichteten ANA dagegen teilweise nicht.
5. In HEP-2 Zellkulturen befinden sich mehr Zellen in der Teilungsphase als auf Rattenleberschnitten, wodurch die eindeutige Identifizierung von anti-centromer AK (sowie Antikörpern gegen Mitosespindeln und andere ausschließlich während der Mitosephase exprimierten Antigene) gewährleistet ist.

Aber:

Bei starken cytoplasmatischen Fluoreszenzen kann die Kernfluoreszenz auf HEP-2 Zellen nicht oder nur schwer interpretiert werden. Bei einer Kernmembranfluoreszenz sind andere ANA Muster nicht oder kaum zu differenzieren, wobei die Kernmembranfluoreszenz selbst nur schwer eindeutig als solche festzustellen ist, da sie dem Fluoreszenzmuster "ANA homogen" gleicht. Weiterhin hängt der Antigengehalt der HEP-2 Zellen von der Anzahl der Passagen (je länger die Zelllinie fortgezüchtet wird, desto weniger differenziert ist der molekulare Kerngehalt), von der optimalen Kultivierung, von der Art der Fixation (SS-A und SS-B Aktivitäten können reduziert bzw. ganz zerstört werden) und von Manipulationen ab, die z.B. vorgenommen werden, um besonders viele Mitosen zu erzeugen. Da die meisten antinukleären Antikörper gegen Antigene gerichtet sind, die während der Interphase (d.h. der G1-, S- und G2-Phase) des Zellzyklus exprimiert werden, sollte sich in zum ANA Nachweis verwendeten HEP-2 Zellkulturen auch die überwiegende Mehrheit der Zellen in dieser Zellzyklusphase befinden. Vom Einsatz synchronisierter Zellkulturen, bei denen der Anteil der Mitosezellen durch den Einsatz von Mitosegiften künstlich erhöht wurde, ist in der ANA Diagnostik unbedingt abzusehen, da in solchen Kulturen oft wichtige, nur in der Interphase exprimierte Antigene fehlen.

Die HEP-2 Zellen des vorliegenden Biognost® ANA IFT stammen also ganz bewusst nicht aus synchronisierten Kulturen, womit der Anteil an Mitosezellen höchstens 10% beträgt und alle Zellzyklusstadien mit ihrer für die einzelnen Stoffwechselphasen jeweils charakteristischen Antigenvielfalt gleichmäßig vertreten sind. Somit erfasst der Biognost® ANA IFT auf HEP-2 Zellen eine maximale Anzahl verschiedener antinukleärer Antikörper, wobei rein mitosespezifische Antigene nicht überproportional häufig vertreten sind. Die Bedingungen für einen echten ANA Screeningtest sind also erfüllt.

Nur bei Seren, die im ANA Screeningtest positiv sind, kann es ratsam sein, weitere Untersuchungen zur ANA Differenzierung anzuschließen. Zu diesem Zweck sind im Bios® Produktprogramm der Biognost® nDNS IFT zum Nachweis von Antikörpern gegen native DNS auf Crithidia luciliae (Best.Nr. 6060 bzw. 6120) enthalten sowie der Biognost® ENA RID, ein radialer Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony zum Nachweis von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der klassischen Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Die Substratobjektträger sind mit Antigen beschichtet. Im ersten Schritt wird Patientenserum auf den Objektträger aufgebracht und inkubiert. Falls im Serum Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen vorhanden sind, werden diese gebunden. Unspezifische Antikörper, sonstige Proteine usw. werden durch einen Waschschriff entfernt. Um eine Beschädigung oder das Ablösen des Antigens zu vermeiden, darf während des Waschens nicht gerührt werden. Nach Auftragen des entsprechenden FITC markierten Antihumanimmunglobulins (Konjugat) und erneuter Inkubation im zweiten Schritt wird nochmals gewaschen, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Der Komplex Antigen / humane Antikörper / Konjugat ist dann unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-500facher Vergrößerung sichtbar.

Beim Nachweis von IgM und/oder IgA Antikörpern wird ein Trennsystem zur Absorption von IgG und Rheumafaktoren (Biosorb®) dem ersten Schritt vorgeschaltet (siehe Punkte INHALT und UNTERSUCHUNGSMATERIAL).

Enthält das zu untersuchende Serum keine Antikörper gegen das entsprechende Antigen, so unterbleibt die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe. Unter dem Mikroskop sind dann auch keine spezifischen Fluoreszenzmuster beobachtbar.

GRENZEN DER METHODE

Die Nachweise mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik weisen qualitativ die jeweiligen Antikörper nach. Der individuelle Antikörpertiter eines Patienten kann nicht als Maß für die Schwere der Erkrankung gesehen werden, da Antikörper von verschiedenen Patienten unterschiedliche Affinitäten aufweisen können. Deshalb ist eine absolute Standardisierung der Ergebnisse schwierig. Andererseits ist dieser Nachteil nämlich die (theoretisch) optimale Breite des Antigenangebots, der größte Vorteil dieser Methode. Indirekte Immunfluoreszenztests sind gute Screening Tests.

Durch den Einsatz positiver Kontrollen, bei denen die Titer angegeben sind, ist eine semiquantitative Aussage möglich.

Das Testergebnis sollte nicht als alleinige Basis zur Beurteilung des klinischen Bildes verwendet werden, er sollte immer im Gesamtzusammenhang (klinische Symptomatik, Zeitpunkt der Probennahme, andere Laborwerte, Hersteller und eigener Referenzbereich etc.) und in Kombination mit anderen verfügbaren Patientendaten gesehen werden.

INHALT DER TESTKITS UND SONSTIGER TESTREAGENZNIEN**1. TESTKITS**

Best.Nr. AN-1060: Biognost® ANA IFT; 60 Bestimmungen: 10 Objektträger mit 6 Auftragstellen; 0,3 ml positive Kontrolle (ANA gesprenkelt); 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 2 ml polyspezifisches Konjugat; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

Best.Nr. AN-1120: Biognost® ANA IFT; 120 Bestimmungen: 10 Objektträger mit 12 Auftragstellen; 0,3 ml positive Kontrolle (ANA gesprenkelt); 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 3 ml polyspezifisches Konjugat; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

Bitte beachten: Die aufgeführten Kits sind nicht immer verfügbar.

2. EINZELREAGENZNIEN**2a. Objektträger:**

Best.Nr. AN-1006; Best.Nr. AN-1012: Biognost® HEP-2 Zellen Objektträger; beschichtet mit HEP-2 Zellen (ATCC CCL-23), 6 bzw. 12 Auftragstellen.

2b. Positive Kontrollen:

Best.Nr. 1202: Biognost® ANA positive Kontrolle, Homogen; stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen Zellkernantigene, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

Best.Nr. AN-1203: Biognost® ANA positive Kontrolle, Gesprenkelt; stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen Zellkernantigene, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

Best.Nr. AN-1204: Biognost® ANA IgG positive Kontrolle, Nukleolär; stabilisiertes Humanserum, enthält IgG Antikörper gegen Nukleoli, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

Best.Nr. AN-1205: Biognost® ANA positive Kontrolle, Centromer; stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen Centromere, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,2 ml.

Best.Nr. AN-1212: Biognost® ANA positive Kontrolle, Nuclear Dots; stabilisiertes Humanserum, enthält Antikörper gegen "p80-coilin" Kernprotein, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,2 ml.

2c. Negative Kontrolle - verwendbar für alle Biognost® autoimmunologischen Immunfluoreszenztests:

Best.Nr. 1111A: Biognost® Autoantikörper negative Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält keine mit der Immunfluoreszenztechnik nachweisbaren Autoantikörper (IgG, IgM, IgA), gebrauchsfertig; 0,5 ml.

2d. Konjugate - verwendbar für alle Biognost® autoimmunologischen Immunfluoreszenztests auf Gewebeschnitten und Zellen:

Best.Nr. 1500; Best.Nr. 15300 bzw. Best.Nr. 151000: Biognost® polyspezifisches Konjugat; Antihumanimmunglobulin für Rattengewebe, Crithidia luciliae und HEP-2 Zellen, FITC markiert, gebrauchsfertig; 2 ml; 3 ml bzw. 10 ml

Best.Nr. 1501; Best.Nr. 15301 bzw. Best.Nr. 151001: Biognost® polyspezifisches Konjugat; Antihumanimmunglobulin G/M/A für Rattengewebe und HEP-2 Zellen, FITC markiert, mit Evans blue Gegenfärbung, gebrauchsfertig; 2 ml; 3 ml bzw. 10 ml

2e. Sonstige Reagenzien - verwendbar für alle Biognost® Immunfluoreszenztests:

Best.Nr. 1605 bzw. Best.Nr. 1606: Biognost® Phosphatpuffer; 4x 5 g bzw. 2x 10 g leicht lösliche PBS Puffer Festsubstanz zur Herstellung von jeweils 500 ml bzw. 1000 ml Pufferlösung; enthält 10 mM NaPhosphat, und 150 mM NaChlorid, pH 7,5.

Best.Nr. 1610 bzw. Best.Nr. 161010: Biognost® Einschlussmedium pH 7,5; gebrauchsfertig; 1,5 ml bzw. 10 ml.

Best.Nr. 1706 bzw. Best.Nr. 17606: Biognost® Saugpapierschablonen für Objektträger mit 6 Auftragstellen; 10 Stück bzw. 60 Stück.

Best.Nr. 1712 bzw. Best.Nr. 17612: Biognost® Saugpapierschablonen für Objektträger mit 12 Auftragstellen; 10 Stück bzw. 60 Stück.

Best.Nr. 1700 bzw. Best.Nr. 17200: Biognost® Deckgläser; 15 Stück bzw. 200 Stück.

2f. IgG/IgM (IgG/IgA) Trennsysteme:

Best.Nr. 90-1048 bzw. Best.Nr. 90-1120: Biosorb®; IgM (IgA) Isolierung mittels anti-human IgG Antiserum; IgM (IgA) Endverdünnung 1:5; 2 ml für ca. 48 Patientenproben (Trennungen) bzw. 5 ml für ca. 120 Patientenproben (Trennungen); Gebrauchsinformation Best.Nr. S0001tid.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Reaktionsgefäße zur Herstellung der Verdünnungsreihen

Pipetten (Bereich 1-1000 µl)

Vortex Mischer

Messkolben (500 ml bzw. 1000 ml) zur Herstellung des Phosphatpuffers

Destilliertes oder demineralisiertes Wasser

Feuchte Kammer

Färbetröge (möglichst groß)

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

Spritzflasche für PBS Puffer
Kurzeitmesser

Dunkelfeld Fluoreszenzmikroskop mit trockenem Objektiv (ohne Immersionsöl zu benutzen) mit Filtern, für eine Anregungswellenlänge von 450-490 nm und eine Emission von 560-590 nm. Für eine höhere Empfindlichkeit ist ein Auflichtmikroskop einem Durchlichtmikroskop vorzuziehen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Objektträger, Kontrollen, Konjugate und Biosorb® müssen bei der jeweils auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Die Objektträger sind weiterhin wegen der Austrocknungs- und Denaturierungsgefahr im geschlossenen Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt zu lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Reagenzien **ungeöffnet** bis zum Verfallsdatum haltbar. Nach Ablauf des Verfallsdatums sind sie nicht mehr zu verwenden.

Nach Anbruch müssen die Reagenzien wieder gut verschlossen und bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur gelagert werden. Sie sind dann schnellstmöglich zu verbrauchen. Der Verfall einer Charge definiert nicht die Haltbarkeit bei Wiederverwendung.

Die PBS Puffer Festsubstanz ist bei Raumtemperatur und darunter **ungeöffnet**, d.h. im Aluminiumbeutel luftdicht verschweißt, unbegrenzt haltbar.

Einschlussmedium, Saugpapierschablonen und Deckgläser sind bei Raumtemperaturlagerung oder niedrigerer Temperatur ebenfalls unbegrenzt haltbar. Das Verfallsdatum auf dem Etikett dient beim PBS Puffer, Einschlussmedium sowie bei den Saugpapierschablonen und Deckgläsern der Organisation der Lagerhaltung. Angesetzte PBS Pufferlösung (pH 7,5) ist am selben Tag zu verbrauchen, da sie kein Konservierungsmittel enthält. Bei Verwendung am nächsten Tag muss sie zwischenzeitlich bei 5-10°C verschlossen gelagert werden. PBS Pufferlösungen mit Schlieren-, Flocken- oder Trübungsbildung bzw. Farb- oder pH-Wert-Änderung sind zu verwerfen.

SICHERHEITSHINWEISE

1. Alle im Punkt INHALT aufgeführten Kits und Reagenzien sind ausschließlich für die in vitro Diagnostik bestimmt.
2. Alle humanen Seren, die zur Herstellung der im Punkt INHALT aufgeführten Zubereitungen aus humanen Seren (Kontrollen) verwendet wurden, wurden auf HBSAg und Antikörper gegen HIV untersucht und für negativ befunden. Da trotzdem die Infektiosität nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, sollten sie mit der entsprechenden Vorsicht verwendet werden.
3. Kontrollen, Konjugate und Einschlussmedium enthalten 0,09% Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Das Verschlucken und Haut- bzw. Schleimhautkontakt ist zu vermeiden. Natriumazidhaltige Reagenzien dürfen nicht mit kupfer- oder bleihaltigen Gegenständen in Verbindung gebracht werden (Bildung explosiver Salze).
4. Einige Konjugate enthalten Evans blue (auf dem Etikett angegeben). Evans blue könnte karzinogen sein (der Schweizer Giftklasse 1* zugeordnet). Vermeiden Sie deshalb das Verschlucken sowie den Hautkontakt mit Evans blue haltigen Lösungen.
5. Sicherheitsbestimmungen der Berufsgenossenschaft und des jeweiligen Institutes (Labors) bezüglich biogefährdenden, giftigen und reizenden Stoffen sind strikt zu beachten (siehe Aushänge, Laborjournal, Sicherheitsbelehrung sowie die aus Zertifizierung bzw. Akkreditierung resultierenden Arbeitsvorschriften).
6. Die aktuellen Regeln der guten Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP) sollten immer beachtet werden.
7. Nach der Testdurchführung sind alle im Test benutzten Reagenzien und Seren entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Als Untersuchungsmaterial kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Bei 5-10°C ist Serum/Plasma ca. 1 Woche haltbar. Für eine längere Lagerung und Mehrfachnutzung sollten Seren/Plasmen in kleinere Portionen (> 50 µl) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei ≤-20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von größeren Mengen an Seren/Plasmen kann zur Bildung von Proteinaggregaten sowie zum Abbau von Serum/Plasmabestandteilen führen und ist deshalb zu vermeiden. Wenn Azid bei den durchzuführenden Untersuchungen nicht stört (wie zum Beispiel leider bei Peroxidase ELISAs) wird Serum/Plasma auch durch Zugabe von 0,09% Azid für längere Zeit (≥ 1 Jahr) im Kühlschrank in der Regel ohne Analytverlust lagerfähig. Beim IgM bzw. IgA Nachweis wird eine Vorbehandlung des Patientenserums notwendig, um Störeffekte durch Rheumafaktoren, welche das Vorhandensein von IgM vortäuschen können, und IgG Antikörper, welche die IgM/IgA Bindung kompetitiv hemmen können, zu vermeiden. Die Trennung der Antikörperklassen kann mit dem von Bios® erhältlichen gebrauchsfertigen Trennsystem Biosorb® durchgeführt werden (siehe Trennsysteme). Obwohl für die IgG/IgM Trennung optimiert, kann Biosorb® auch zur Probenvorbehandlung bei IgA Bestimmungen verwendet werden. IgG Antikörper werden aus der Probe entfernt, während IgM und der größte Teil der IgA Antikörper in der Probe verbleiben. Durch die Vorbehandlung werden die Proben verdünnt. Der Verdünnungsfaktor von 1:5 ist bei der Herstellung der Testverdünnungen für den IgM bzw. IgA Nachweis zu berücksichtigen. Die Trennung sollte unmittelbar vor dem Testansatz erfolgen.

QUALITÄTSKONTROLLE UND FEHLERSUCHE

Eine positive Kontrolle für jeden zu interpretierenden Parameter und eine negative Kontrolle sollten bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Ergeben die Kontrollen nicht die auf dem Etikett angegebenen Ergebnisse, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Kann der auf dem Etikett der positiven Kontrolle angegebene Titer (± 1 bis 2 Verdünnungsstufen) im Anwenderlabor nicht reproduziert werden, so sollte überprüft werden, ob ausschließlich Biognost® Testreagenzien im Testansatz verwendet wurden oder z.B. andere Deckgläser, anderes Einschlussmedium, nicht frisch angesetzter Biognost® Puffer. Weiterhin muss überprüft werden, ob das benutzte Fluoreszenzmikroskop einwandfrei funktioniert; mögliche Fehlerquellen sind ölverschmutzte Objektive, Dejustierung oder eine zu schwache Lampe. Desweiteren ist zu prüfen, ob die Reagenzien richtig gelagert wurden bzw. bereits verfallen sind, ob die im Testansatz verwendete feuchte Kammer feucht genug ist, ob der Objektträger mit einem Filzstift beschriftet wurde (bitte nur harten Bleistift benutzen) etc. Auch sollten die Reagenzien auf keinen Fall durch Erhitzen auf Raumtemperatur gebracht werden.

Konjugate können durch die Pufferleerwertkontrolle auf eventuelle unspezifische Anfärbung des Substrates überprüft werden: Analog den Kontrollen oder den vorverdünnten Patientenserum wird auf eine Auftragstelle die entsprechende Menge PBS Pufferlösung aufgetragen und der üblichen Testdurchführung unterworfen. Die Sensitivität und Spezifität dieses Tests unterliegt einer ständigen Überwachung durch das Bios® Kontrolllabor. Bios® setzt alle verfügbaren WHO oder anderweitig definierten Kontroll- bzw. Serumstandards zur Teststandardisierung ein.

Die Biognost® positiven und negativen Kontrollen sind anhand der verfügbaren Standards oder Seren von klinisch charakterisierten Patienten bzw. Blutspendern kalibriert.

Eine Gewährleistung durch die Firma Bios® ist nur dann gegeben, wenn die Angaben der Gebrauchsinformation exakt eingehalten, im Test nachweislich nur Bios Produkte eingesetzt werden und der Test nur durch Fachpersonal durchgeführt wird.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Biognost® Objektträger, Kontrollen und das Konjugat sind gebrauchsfertig, sobald sie sich auf Raumtemperatur erwärmt haben (ca. 5 min). Die Kontrollen und das Konjugat sind also unverdünnt zu benutzen.

Hinweise für die Benutzung von Biosorb® als IgG/IgM (IgG/IgA) Trennsystem sind im Punkt INHALT und in der Gebrauchsinformation Best.Nr. S0001tid zu finden. Die Biognost® Kontrollen sind soweit notwendig vorgetrennt. Sie sollen weder einer Trennung in Bezug auf Immunglobulinklassen noch gegebenenfalls einer Absorption unterzogen werden.

Die Biognost® Objektträger sind gebrauchsfertig fixiert. Die Substrate können bei einem weiteren Fixierschritt zerstört werden.

Vor Beginn des Testansatzes sind die Seren entsprechend den Vorgaben (Screeninguntersuchung, Titration) mit PBS Pufferlösung oder einer Lösung aus PBS mit 1% Rinderserumalbumin zu verdünnen.

Das Pipettierschema des Tagesansatzes muss vor Beginn des Testansatzes schriftlich in einem dafür vorgesehenen Formular festgelegt werden. Dieses Formular ist die Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse und deren Dokumentation.

1. Objektträger vorsichtig aus der Alu-Verpackung nehmen (Einkerbung zum Aufreißen ist vorgestanz!), ohne die Auftragstellen zu berühren. Zum Beschriften der Objektträger nur harten Bleistift, niemals Filzstift verwenden.
2. Kontrollen und vorverdünnte Patientenserum auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50 µl).

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biotik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® auf Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,
Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

3. Objektträger 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
4. Objektträger feuchter Kammer entnehmen, Serum- bzw. Flüssigkeitsüberschuss mit PBS vorsichtig abspülen (Strahl aus Spritzflasche dabei keinesfalls direkt auf die Auftragstelle richten!).
5. 2x 5 min in PBS Puffer waschen (nach 1x 5 min Wechsel in neuen Puffer); möglichst große Färbetröge benutzen, und den (die) Objektträger im PBS Puffer nicht bewegen bzw. nicht rühren.
6. Objektträger mit Saugpapierschablonen trocknen, aber Substrat dabei nicht trocken werden lassen und deshalb sofort anschließend
7. das entsprechende Konjugat auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50 µl). Ein Tropfen aus Biognost® Konjugatflaschen entspricht ca. 25 µl.
8. Objektträger lichtgeschützt 30 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Dabei speziell vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und Heizungsnähe meiden.
9. Schritte 4-6 wiederholen. Objektträger nicht mit destilliertem Wasser spülen, sondern sofort
10. 2-3 kleine Tropfen Einschlussmedium auf dem Objektträger verteilen, Präparat luftblasenfrei mit Deckglas versehen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Bei dunkler und kühler Aufbewahrung kann innerhalb der folgenden 24 Stunden ausgewertet werden. Nicht eingedeckte Präparate müssen sofort mikroskopiert werden. Übergelaufenes Einschlussmedium vorsichtig mit einem mit PBS angefeuchteten Papiertuch entfernen, um ein Ankleben am Mikroskopisch bzw. im Präparatebehälter zu vermeiden. Langzeitkonservierung der Präparate: Versiegeln der Kanten mit etwas farblosem Nagellack, Lagerung bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ bis zu mehreren Jahren.

BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Die Präparate werden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-500fachen Vergrößerung beurteilt (Filterbereich 450-490 nm). Nicht zu lange ein und dasselbe Gesichtsfeld mustern, sondern in rascher Folge möglichst viele Gesichtsfelder auswerten, um das Ausbleichen des Präparats zu vermeiden. Ein Testansatz kann nur dann bewertet werden, wenn die mitgeführten Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen.

Fluoreszenzmuster:

Zur Auswertung muss die Anfärbung der Zellkerne der HEp-2 Zellen beurteilt werden.

Positiv:

Die spezifische Fluoreszenz ist eine helle apfelgrüne Farbe mit unterschiedlicher Intensität: von 1+ schwach; über 2+ mäßig; 3+ stark bis 4+ brilliant.

Negativ:

Fluoreszenzen mit geringerer Intensität als 1+ werden als negativ beurteilt. Gelbliche oder dunkelgrüne Fluoreszenzen sind unspezifisch und dürfen nicht berücksichtigt werden.

Titer:

Der Titer ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, bei der noch mindestens eine 1+ Fluoreszenz zu sehen ist.

Beispiel: Wird die 1:80 Verdünnung mit 1+ positiv bewertet, die 1:160 Verdünnung aber negativ, so ist der Titer 80.

Zielantigen oder Zielstruktur:

Eine Probe wird als ANA positiv beurteilt, wenn mindestens eine 1+ Fluoreszenz bei mindestens 50% der Zellen (bei Centromer AK mindestens 5%) zu sehen ist. Antikörper gegen die einzelnen Zellkernantigene rufen im Immunfluoreszenztest unterschiedliche Fluoreszenzmuster hervor, die Hinweise auf bestimmte Krankheiten geben können, da erfahrungsgemäß Korrelationen zwischen dem Auftreten einzelner antinukleärer Antikörper und bestimmten Autoimmunerkrankungen bestehen. Die Beschreibung verschiedener Fluoreszenzmuster in der ANA Diagnostik stellt jedoch nur eine grobe Einteilung der antinukleären Antikörper dar, da ein und dasselbe Fluoreszenzmuster von unterschiedlichen ANA Typen verursacht werden kann und bei den meisten ANA positiven Seren sogar ein Gemisch aus mehreren antinukleären Antikörpern vorliegt. Die Interpretation von Fluoreszenzmustern in der ANA Diagnostik sollte deshalb immer mit Vorsicht geschehen. Eine eindeutige Charakterisierung der beteiligten Antigen-Antikörper-Systeme ist mit der indirekten Immunfluoreszenz auf HEp-2 Zellen nämlich nicht möglich. Die einzige Ausnahme stellt das Muster anti-centromer dar, welches auf HEp-2 Zellen aufgrund der "paketförmigen" Zusammenlagerungen der Centromeren (Kinetochoren) in Mitosekernen eindeutig interpretiert werden kann.

Zu diesem Zweck sind ANA Differenzierungstests z.B. von Antikörpern gegen nDNS auf Crithidien mittels Immunfluoreszenz bzw. von ANA gegen extrahierbare Kernantigene (ENA) durch radiale Immundiffusion nach Ouchterlony erforderlich (vgl. Punkt EINLEITUNG).

Üblicherweise unterscheidet man in der ANA Diagnostik mit der indirekten Immunfluoreszenz die folgenden Fluoreszenzmuster:

ANA positiv - homogen

Fluoreszenzmuster: Gleichmäßig grüne Fluoreszenz des gesamten Kernlumens.

Zielantigene: Chromatin, d.h.: DNA (dsDNA oder ssDNA), Histone/Histonkomplexe, Ku, RNP (Ribonucleoprotein) oder andere reichlich mit Chromatin assoziierte Nicht-Histonproteine.

Zur Beachtung: Das Fluoreszenzmuster "ANA homogen" wird oft nur in niedrigen Verdünnungsstufen gefunden. In höherer Verdünnung können auch andere ANA Fluoreszenzmuster auftreten, je nachdem, welche ANA Typen mit den höchsten Titern im Serum vorliegen.

Assoziierte Krankheiten: Eine homogene Kernfluoreszenz tritt relativ häufig auf bei SLE, medikamenteninduziertem Lupus, rheumatoider Arthritis, juveniler chronischer Arthritis.

ANA positiv - gesprenkelt

Fluoreszenzmuster: Es fluoreszieren mehr oder weniger große Sprengel innerhalb des Kernlumens, von kleinen scharfrandigen Punkten bis zu großen, diffus begrenzten Schollen. Feine, mittlere und grobe Sprengel können isoliert oder nebeneinander auftreten. Die Verteilung kann von Kern zu Kern variieren, je nach dessen Funktionszustand (Mitose-, Interphase-, Ruhekern).

Zielantigene: Extrahierbare Kernantigene (ENA), wie Sm, Scl 70, nRNP, SS-B (Ro), SS-A (La) und andere.

Zur Beachtung: Je nach dem/den beteiligten Antigen-Antikörper-System/en gibt es viele Varianten des gesprenkelten Fluoreszenzmusters.

Assoziierte Krankheiten: Das gesprenkelte ANA Muster findet man z.B. bei MCTD, SLE und anderen chronischen rheumatischen Erkrankungen, Sklerodermie, Sjögren Syndrom, Dermato-/Polymyositis. Auch die niedrigtitrigen ANA positiven Seren älterer, gesunder Menschen sind oft gesprenkelt.

ANA positiv - nukleolär

Fluoreszenzmuster: In den Interphasekernen ist eine deutliche Fluoreszenz (wenige Sprengel pro Zellkern) der Nukleoli zu erkennen. Da sich die Nukleoli zu Beginn der Mitosephase auflösen, sieht man in den Mitosekernen eine gleichmäßig verteilte sehr feine Fluoreszenz der in diesen Kernen über den ganzen Zellkern verteilten nukleolären Proteine.

Zielantigene: PM-Scl, Ku, U3snRNP, RNA-Polymerase I und andere.

Assoziierte Krankheiten: Das nukleoläre Kernfluoreszenzmuster tritt (oft recht hochtitrig) bei bis zu 90% der Patienten mit progressiver systemischer Sklerose auf sowie bei 50% der Polymyositis-Sklerodermie-Patienten.

ANA positiv - centromer

Fluoreszenzmuster: Fluoreszenz als kleine deutlich voneinander abgrenzbare Punkte im Kernlumen der Interphasekerne. In den Mitosekernen (kurz vor und nach der Kernteilung) ist eine balkenförmige Konzentration der fluoreszierenden Punkte im kondensierten Chromatin zu sehen.

Zielantigene: 3 Proteine am Centromer der Chromosomen (CENT-A, CENT-B, CENT-C).

Assoziierte Krankheiten: Die Fluoreszenz der Centromere findet man sehr häufig und oft hochtitrig bei der CREST-Variante der Sklerodermie und bei Patienten mit Raynaud Syndrom (allein oder kombiniert mit anderen Symptomen).

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® an Recipe® are registered trademarks of Bios® GmbH, Germany

Die mit ® gekennzeichneten Warenzeichen in diesem Text sind Eigentum der Fa. Bios GmbH.

Die Gebrauchsinformationen der Firma Bios Labordiagnostik GmbH sind geistiges Eigentum der Fa. Bios und nur nach den Vorgaben der Firma Bios zu verwenden.

Bios® Labordiagnostik GmbH, Hofmannstr. 7, D-81379 München,

Fon/Fax: +49 89/898895-41/40, e-mail: bios@bios-world.com

ANA positiv - nuclear dots

Fluoreszenzmuster: Einzelne liegende Punkte (etwa 5 - 15 pro Zellkern). Das Muster ähnelt etwas dem centromeren, aber es sind weniger Punkte zu sehen, die sich nie in einer Ebene der (Mitose-) Zellkerne konzentrieren.

Zielantigene: p80-Coilin (snRNP assoziiert), Sp100 Kernproteine mit unbekannter Funktion.

Assoziierte Krankheiten: Das Fluoreszenzmuster "nuclear dots" ist charakteristisch für primäre biliäre Zirrhose (oft in Kombination mit Sjögren Syndrom und seltener mit SLE) sowie chronisch aktive Hepatitis. In selteneren Fällen wurde auch ein Zusammenhang zu anderen chronisch entzündlichen Bindegeweberkrankungen gefunden.

Interpretation der Ergebnisse:**1. Referenzbereich und Spezifität:**

Referenzbereiche können bei der Befundinterpretation eine Orientierungshilfe darstellen. Referenzbereiche geben an, welche Messwerte (Titer, Extinktion) bei gesunden Normalpersonen zu erwarten sind. Referenzbereiche sind eine statistische Größe und können in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs (Alter, Geschlecht, Geographie) sowie in Abhängigkeit von der jeweiligen Messmethode differieren. Zwischen Kranken und Gesunden besteht messtechnisch generell keine scharfe Grenze, vielmehr ist der Übergang meist fließend.

Definitionsgemäß umfasst der Referenzbereich nur 95% des gemessenen Konzentrationsbereichs. 5% der gesunden Personen des untersuchten Kollektivs liegen demnach außerhalb des Referenzbereiches ohne krank zu sein.

Ein innerhalb des Referenzbereiches liegendes Laborergebnis schließt daher eine Krankheit nicht sicher aus. Ein außerhalb liegendes Ergebnis ist für sich alleine kein zwingender Beweis für eine Krankheit.

Untersuchung von gesunden Blutspendern:

Basierend auf der Auswertung von gesunden Blutspendern im Alter zwischen 22 und 40 Jahren aus allen Teilen Deutschlands sowie dem angrenzenden Ausland (Österreich, Schweiz, Luxemburg, Frankreich, Holland) wurden für den Biognost® ANA IFT folgende Referenzbereiche ermittelt.

ANA auf HEp-2 Zellen

Anzahl der Blutspender: 564

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 512

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 9

Mittlerer Durchseuchungstiter: 17

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:16 oder 1:10

Spezifität:

Nach der Ermittlung des Referenzbereiches kann die diagnostische Spezifität des Assays daraus abgeleitet werden.

Die Spezifität eines Tests gibt an, wie viel Prozent der Gesunden ein „normales“ Testergebnis haben („richtig negativ“). Die Anzahl aller Gesunden entspricht der Summe aus „richtig negativ“ und „falsch positiv“.

Die diagnostische Spezifität wird gemäß folgender Formel definiert:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig Negative}}{\text{Anzahl richtig Negative} + \text{Falsch Positive}} \times 100 \%$$

Für den Biognost® ANA IFT HEp-2 Zellen ergibt sich eine Spezifität von 98%.

2. Sensitivität:

Untersuchung von erkrankten Personen:

Die Sensitivität eines Tests gibt an, wieviel Prozent der Kranken ein pathologisches Testergebnis haben („richtig positiv“). Die Anzahl aller Erkrankten entspricht der Summe aus „richtig positiv“ und „falsch negativ“.

ANA auf HEp-2 Zellen

Anzahl der Patienten: 35

Messergebnisse (Titer): 1024 - 16384

Messwerte unterhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 0

Die diagnostische Sensitivität wird gemäß folgender Formel definiert:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig Positive}}{\text{Anzahl richtig Positive} + \text{Falsch Negative}} \times 100 \%$$

Für den Biognost® ANA auf HEp-2 Zellen ergibt sich eine Sensitivität von 100%.

Da bei Menschen > 50 Jahre häufig ANA ohne pathologische Bedeutung gefunden werden, krankheitsassoziierte ANA dagegen normalerweise in hohen Titern vorkommen, empfehlen wir bei Patienten dieser Altersgruppe, ANA Titer < 80 als negativ zu bewerten.

Obige Werte sollten in den einzelnen Labors kritisch überprüft werden. Werden Seren von Kindern untersucht, sollte die Grenze positiv/negativ abgesenkt werden. Bei älteren, gesunden Menschen sind häufig ANA in niedrigen Titern von 40 bis 160 zu beobachten, von denen bisher aber keine diagnostische Bedeutung bekannt ist, daher sollte der Grenztiter bei Patienten über 50 Jahre gegebenenfalls auf 160 angehoben werden. Jedes Labor sollte eigene Grenztiter unter Einbeziehung der regionalen Besonderheiten definieren. Vor allem bei Kindern, Senioren und immungeschwächten Patienten sollte mit niedrigeren Grenztitern gearbeitet werden. Statistische Auswertungen können bei Fallzahlen unter 10 000 Datensätzen ungenau sein.

Nebenergebnisse:

Folgende Fluoreszenzmuster können Hinweise auf weitere Autoantikörper geben (HEp-2 Zellen sind dafür jedoch nicht die empfohlenen Referenzsubstrate!):

Fluoreszenz der Mitochondrien durch AMA:

In den HEp-2 Zellen ist eine cytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen, wobei Mitochondrien, die sich auf der Zellkernoberfläche, oder oberhalb des Zellkernes befinden, nicht von leuchtenden Punkten innerhalb des Kernlumens unterschieden werden können.

Das Ergebnis "AMA positiv" sollte auf Biognost® Rattenniere (Best.Nr. 2004 bzw. 2008) abgesichert werden.

Fluoreszenz der glatten Muskulatur durch ASMA:

Auf den HEp-2 Zellen ist eine positive ASMA Reaktion nicht auf glatte Muskulatur, sondern auf eine Kreuzreaktion von ASMA mit Cytoskelettproteinen wie z.B. Aktin zurückzuführen.

Das Ergebnis "ASMA positiv" sollte auf Biognost® Rattenmagen (Best.Nr. 3004 bzw. 3008) abgesichert werden.

Fluoreszenz des Cytoplasmas durch antiribosomale AK (ARA):

Auf den HEp-2 Zellen färben Antikörper gegen Ribosomen (ARA) das Cytoplasma diffus, wobei der Bereich um den Zellkern besonders betont ist. Das Ergebnis "ARA positiv" sollte auf einem Kombinationsschnitt (Rattenleber/-magen/-niere) (Best.Nr. 2134 bzw. 2138) abgesichert werden.

LITERATUR

1. Tan E.M., Chan E.K.L., Sullivan K.F., Rubin R.L.: Antinuclear Antibodies (ANAs): Diagnostically Specific Immune Markers and Clues Toward the Understanding of Systemic Autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopathol. 47, 1988, 121-141.
2. Bradwell A.R., Stokes R.P., Johnson G.D.: Atlas of HEp-2 patterns and laboratory techniques. KNP Group Ltd., Redditch B98 0RE, 1995.
3. Tomer Y., Buskila D., Shoenfeld Y.: Pathogenic Significance and Diagnostic Value of Lupus Antibodies. Int. Arch. Allergy Immunol. 100, 1993, 293-306.
4. Molden D.P.: ANA profiles in systemic rheumatic disease. Diagn. Med. June, 1985, 12-18.
5. Nakamura R.M., Peebles C.L., Molden D.P., Tan E.M.: Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. Lab. Medicine 15 no. 3, 1984, 190-198.
6. Bernstein R.M., Neuberger J.M., Bunn C.C., Calender M.E., Hughes G.R.V., Williams R.: Diversity of Autoantibodies in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 55, 1984, 553-560.
7. Hansen B.U., Eriksson S., Lindgren S.: High Prevalence of Autoimmune Liver Disease in Patients with Multiple Nuclear Dot, Anti-Centromere, and Mitotic Spindle Antibodies. Scand. J. Gastro. 26, 1991, 707-713.
8. James K., Meek G.: Evaluation of Commercial Enzyme Immunoassays Compared to Immunofluorescence and Double Diffusion for Autoantibodies Associated with Autoimmune Diseases. Am. J. Clin. Pathol. 97, 1992, 559-565.
9. Prost A.C., Abuaf N., Rouquette-Galley A.M., Homberg J.C., Combrisson A.: Comparing HEp-2 cell line with rat liver in routine screening test for antinuclear and antinuclear autoantibodies in autoimmune diseases. Ann. Bio. clin. 45, 1987, 610-617.
10. Weller T.H., Coons A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varizella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 1954, 789-794.
11. Riggs J.L., Siewald R.J., Burckhalter J.H., Downs C.M., Metcalf T.G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol. 34, 1958, 1081-1097.
12. Thomas, Lothar: Labor und Diagnose, 5. Auflage 1998, 1495.
13. Feist E., Brychcy M., Hausdorf G., Hoyer B., Egerer K., Dörner T., Kuckelkorn U., Burmester G.-R.: Anti-proteasome autoantibodies contribute to anti-nuclear antibody patterns on human larynx carcinoma cells. Ann. Rheum. Dis, 2007; 66:5-11.
14. Wichainun R., Kasitanon N., Wangkaew S., Hongsongkiat S., Sukitawut W., Louthrenoo W.: Asian Pac J Allergy Immunol 2013, 31, 292 – 298.