



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® ANCA IgG NACHWEIS**

INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZTEST zum Nachweis von ANCA in humanem Serum

1. Nachweis von C- und P-ANCA auf ETHANOLFIXIERTEN HUMANEN GRANULOZYTEN

Testkit für 60 IgG Bestimmungen, Best.Nr. 76060

Testkit für 120 IgG Bestimmungen, Best.Nr. 76120

Alle Reagenzien der Testkits sind auch einzeln erhältlich

2. Nachweis von X-ANCA auf METHANOLFIXIERTEN HUMANEN GRANULOZYTEN

Objektträger mit 6 Auftragstellen, Best.Nr. 7806

Testdauer: ca. 90 min

Beim **C-ANCA, P-ANCA oder X-ANCA** Nachweis auf neutrophilen Granulozyten werden die Seren zum Screenen 1:2, zum Titrieren gemäß 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 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® ANCA IgG Nachweis ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung von Autoantikörpern gegen Antigene des neutrophilen Zytoplasma in humanem Serum. Der Biognost® ANCA IFT ist zum Einsatz in der Diagnostik von autoimmunen Nierenerkrankungen und Vaskulitiden bestimmt.

EINFÜHRUNG

Nachdem 1982 von Davies et al. das Vorkommen von gegen Granulozytenantigene gerichteten Antikörpern bei Patienten mit nekrotisierender Glomerulonephritis publiziert wurde, gelang 1985 zum ersten Mal der Nachweis solcher krankheitsspezifischer Autoantikörper bei der Wegenerschen Granulomatose. Diese Antikörper reagieren mit zytoplasmatischen Bestandteilen der neutrophilen Granulozyten und werden deshalb "anti-neutrophil cytoplasm antibodies" (= ANCA) genannt (Synonym: ACPA).

Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest auf ethanolfixierten humanen neutrophilen Granulozyten, der Standardmethode zum Nachweis von ANCA, lassen sich grundsätzlich zwei Arten von Fluoreszenzmustern unterscheiden: der C-ANCA Typ, bei dem man eine feingranuläre zytoplasmatische Anfärbung beobachtet und der P-ANCA Typ, bei dem eine (peri)nukleäre Anfärbung vorliegt. Der P-ANCA Nachweis besitzt besonders bei der rapid-progressiven und der idiopathischen Glomerulonephritis sowie bei der Polyarteriitis nodosa diagnostische Relevanz, während C-ANCA vor allem mit der klassischen Wegenerschen Granulomatose in Zusammenhang steht. Beide ANCA Typen können gemeinsam bei der mikroskopischen Polyarteriitis und dem Churg-Strauss-Syndrom auftreten. Für beide Anfärbungen wurden mehrere Zielantigene nachgewiesen: Bei der Mehrheit der P-ANCA positiven Seren ist Myeloperoxidase (= MPO) das Zielantigen. Das mit Abstand häufigste C-ANCA Zielantigen ist Proteinase 3 (= PR 3). Azurozidin, Lactoferrin, Elastase, Cathepsin G, Lysozym und BPI (bakterizides, permeabilitätssteigerndes Protein) sind weitere derzeit bekannte P- und / oder C-ANCA Zielantigene. Gegen letztere Autoantigene gerichtete Antikörper werden mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes oder der Leber assoziiert.

Vermutlich werden zukünftig noch weitere ANCA Subpopulationen identifiziert und einzelnen Krankheiten zugeordnet werden. Anders ausgedrückt: es werden weitere zytoplasmatische Granulozytenantigene gefunden, die Granulozyten Autoimmunität induzieren. Solange die humanen neutrophilen Granulozyten das offiziell empfohlene und allgemein verwendete ANCA Substrat bleiben, gewährleistet die Verwendung dieses Substrates optimale und vergleichbare Screening Ergebnisse. Alle bisher und zukünftig gefundenen bzw. zu findenden ANCA Antigene liegen in diesem Substrat vor.

Der ANCA IgG IFT auf ethanolfixierten humanen neutrophilen Granulozyten ist als Screeningtest für die ANCA Diagnostik geeignet, der sowohl die feingranulären zytoplasmatischen Anfärbungen des C-ANCA Typs als auch die (peri)nukleären Anfärbungen des P-ANCA Typs erfasst. Patientenserum, die gleichzeitig ANA positiv sind, verursachen auf ethanol- und methanolfixierten humanen Granulozyten Fluoreszenzmuster, die kaum von "echten" P-ANCA Anfärbungen unterschieden werden können. Bei Seren, die im ANCA IgG IFT ein (peri)nukleäres Fluoreszenzmuster liefern, sollte daher zur Abgrenzung von P-ANCA gegen ANA ein ANA Test auf HEp-2 Zellen durchgeführt werden. P-ANCA positive Seren sind hier negativ. Zur ANA Abklärung kann der Biognost® ANA IFT auf HEp-2 Zellen (Best.Nr. AN-1060, AN-1120 und AN-1240) eingesetzt werden.

Bei einer Reihe nichtvaskulitischer Erkrankungen wie SLE, Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Primärer biliärer Zirrhose, Colitis ulcerosa u.a. werden ebenfalls ANCA (auch als atypische P-ANCA oder X-ANCA bezeichnet) gefunden. Die diagnostische Bedeutung dieser ANCA ist noch unklar. Diese atypischen P-ANCA (X-ANCA) verhalten sich im Immunfluoreszenztest auf ethanolfixierten und methanolfixierten Granulozyten wie die den Vaskulitiden zuzuordnenden P-ANCA und zeigen eine perinukleäre Anfärbung. C-ANCA zeigen bei beiden Fixierungen immer eine zytoplasmatische Anfärbung der Granulozyten. Der Nachweis von X-ANCA ist daher nur eindeutig möglich, wenn P- und C-ANCA sicher ausgeschlossen werden können.

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, es 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.

Bios®, Biosite®, Biognost®, Biolisa®, Biosave®, Biosorb®, Biomedix®, Bionostix®, Biostik®, Biochip®, Bioservice®, Biotainer®, Biodata®, Diagnos® and 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

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

Best.Nr. 76060: Biognost® ANCA IgG IFT (ethanolfixiert); 60 Bestimmungen: 10 Objektträger mit 6 Auftragstellen; 0,3 ml C-ANCA positive Kontrolle; 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 2 ml IgG Konjugat mit Evans blue; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

Best.Nr. 76120: Biognost® ANCA IgG IFT (ethanolfixiert); 120 Bestimmungen: 10 Objektträger mit 12 Auftragstellen; 0,3 ml C-ANCA positive Kontrolle; 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 3 ml IgG Konjugat mit Evans blue; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

Bitte beachten: Die aufgeführten Kits sind nicht immer verfügbar.

2. EINZELREAGENZIEN**2a. Objektträger:**

Best.Nr. 7606 bzw. Best.Nr. 7612: Biognost® C-ANCA Objektträger; beschichtet mit humanen neutrophilen Granulozyten, ethanolfixiert; 6 bzw. 12 Auftragstellen.

Best.Nr. 7806: Biognost® X-ANCA Objektträger, beschichtet mit humanen neutrophilen Granulozyten, methanolfixiert; 6 Auftragstellen.

2b. Positive Kontrollen:

Best.Nr. 7601: Biognost® C-ANCA positive Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält C-ANCA, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

Best.Nr. 7602: Biognost® P-ANCA positive Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält P-ANCA, gebrauchsfertig, Titerangabe auf dem Etikett; 0,3 ml.

Best.Nr. 7604*: Biognost® X-ANCA positive Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält X-ANCA, 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. 1501G; Best.Nr. 15301G bzw. Best.Nr. 151001G: Biognost® IgG Konjugat; Antihumanimmunglobulin G für Rattengewebe, Granulozyten und HEP-2 Zellen, FITC markiert, mit Evans blue Gegenfärbung, gebrauchsfertig; 2 ml, 3 ml bzw. 10 ml.

Best.Nr. 1500G; Best.Nr. 15300G bzw. Best.Nr. 151000G: Biognost® IgG Konjugat; Antihumanimmunglobulin G für Rattengewebe, Crithidia luciliae und HEP-2 Zellen, FITC markiert, 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. 1703 bzw. Best.Nr. 17603: Biognost® Saugpapierschablonen für Objektträger mit 3 Auftragstellen; 10 Stück bzw. 60 Stück.

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)

Spritzflasche für PBS Puffer

Kurzzeitmesser

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.

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

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 ölverschnittene 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 vortrennt. 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).
 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 Präparatebehältnis zu vermeiden. Langzeitkonservierung der Präparate: Versiegeln der Kanten mit etwas farblosem Nagellack, Lagerung bei ≤-20°C bis zu mehreren Jahren.
- Dieser Test ist für den automatisierten (gerätegestützten) Testansatz nicht ausgetestet.

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 des Zytoplasmas oder die Anfärbung des (peri)nukleären Bereiches der humanen neutrophilen Granulozyten 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 ANCA positiv beurteilt, wenn mindestens eine 1+ Fluoreszenz des jeweiligen Fluoreszenzmusters auf den humanen neutrophilen Granulozyten zu sehen ist.

C-ANCA

Granulozyten, ethanolfixiert: zytoplasmatisch

Granulozyten, methanolfixiert: zytoplasmatisch

HEp-2 Zellen: negativ

P-ANCA

Granulozyten, ethanolfixiert: perinukleär

Granulozyten, methanolfixiert: perinukleär

HEp-2 Zellen: negativ

X-ANCA

Granulozyten, ethanolfixiert: perinukleär

Granulozyten, methanolfixiert: perinukleär

HEp-2 Zellen: negativ

ANA

Granulozyten, ethanolfixiert: nukleär/perinukleär

Granulozyten, methanolfixiert: nukleär/perinukleär

HEp-2 Zellen: nukleär

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® ANCA IgG IFT folgende Referenzbereiche ermittelt.

C-ANCA

Anzahl der Blutspender: 221

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 8

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 5

Mittlerer Durchseuchungstiter: 1

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:2

P-ANCA

Anzahl der Blutspender: 221

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 8

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 3

Mittlerer Durchseuchungstiter: 1

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:2

X-ANCA

Anzahl der Blutspender: 221

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 2

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 0

Mittlerer Durchseuchungstiter: 1

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:2

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® C-ANCA IFT ergibt sich eine Spezifität von 98%, für den Biognost® P-ANCA IFT von 99% und für den Biognost® X-ANCA IFT von 100%.

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

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“.

C-ANCA

Anzahl der Patienten: 27

Messergebnisse (Titer): 32 - 1024

Messwerte unterhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 0

P-ANCA

Anzahl der Patienten: 15

Messergebnisse (Titer): 40 - 1024

Messwerte unterhalb des Referenzbereiches: Anzahl: 0

X-ANCA

Anzahl der Patienten: 7

Messergebnisse (Titer): 80 - 512

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® C-ANCA IFT, für den Biognost® P-ANCA IFT und für den Biognost® X-ANCA IFT ergibt sich jeweils eine Sensitivität von 100%.

Obige Werte sollten in den einzelnen Labors kritisch überprüft 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 ungenau sein.

LITERATUR

1. Van der Woude F.J., Rasmussen N., Lobatto S., Wiik A., Permin H., van Es L.A., van der Giessen M., van der Hem G.K.: Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *The Lancet*. 23, 1985, 425-429.
2. Falk R.J., Sartor R.B., Jones D.A., Jeffries B.D., Jenette J.C.: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *New. Engl. J. Med.* 318, 25, 1988, 1651-1657.
3. Goldschmeding R., Cohen Tervaert J.W., Gans R.O.B., Dolman K.M., van den Ende M.E., Kuizinga M.C., Kallenberg C.G.M., van dem Borne A.E.G.K.: Different immunological specificities and disease associations of C-ANCA and P-ANCA. *Netherlands J. Med.* 36, 3, 1990, 114-116.
4. Lüdemann G., Nölle B., Rautmann A., Rosenboom S., Kekow J., Gross W.L.: Antizytoplasmatische Antikörper als Seromarker und Aktivitätsparameter der Wegenerschen Granulomatose. *Dtsch. med. Wschr.* 113, 1988, 413-417.
5. Nölle B., Gross W.L.: Antizytoplasmatische Antikörper (ACPA) in der Vasculitidiagnostik. *Immun. Infekt.* 16, 1988, 68-70.
6. Rosenboom S., Rautmann A., Gross W.L.: Anti-zytoplasmatische Antikörper (ACPA) in der indirekten Immunfluoreszenz: Probleme beim Testaufbau und bei der Testbeurteilung. *Lab.med.* 12, 1988, 339-345.
7. Wiik A., van der Woude F.J.: The new ACPA/ANCA nomenclature. *Netherlands J. Med.* 36, 1990, 107-108.
8. Rasmussen N., Wiik A., Hoier-Madsen M., Borregaard N., van der Woude F.J.: The international serum standard of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) according to the 1st international workshop on ANCA, 1988. *APMIS* 97, suppl. 6, 1989, 30.
9. Wiik A.: Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 97, suppl. 6, 1989, 12-13.
10. Kallenberg C.G.M., Cohen Tervaert J.W., Huijtema M.G., van der Giessen M.: Towards standard sera for the determination of anti-neutrophil cytoplasmic (ANCA) and anti-myeloperoxidase (aMPO) antibodies. *APMIS* 97, suppl. 6, 1989, 14-15.
11. Falk R.J., Hogan S.L., Wilkman A.S., Terrell R.S., Lauritzen S., Charles L.A., Jennette J.C.: Myeloperoxidase specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA). *Netherlands J. Med.* 36, 1990, 121-125.
12. Nölle B., Specks U., Lüdemann J., Rohrbach M.S., DeRemee R.A., Gross W.L.: Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 111, 1989, 28-40.
13. Rasmussen N., Wiik A.: Indirect immunofluorescence examination for IgG-ANCA in sera submitted for the 1st international workshop on ANCA, 1988. *APMIS* 97, suppl. 6, 1989, 16-20.
14. Bradwall A.R.: Laboratory diagnosis and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Eur. Clin. Lab.* 10, 1996, 28.
15. Andrassy K., Koderisch J., Rasmussen N., Ritz E.: Diagnostische Bedeutung antineutrophiler Zytoplasmatischer Antikörper bei Wegenerscher Granulomatose und verwandten Krankheitsbildern. *Dtsch. med. Wschr.* 114, 1989, 23-26.
16. Savage C.O.S.: Microscopic polyarteritis: Definition and relation to Wegeners granulomatosis. *APMIS* 97, suppl. 6, 1989, 8-9.
17. Zhao M.H., Jones S.J., Lockwood C.M.: Bactericidal permeability increasing protein (BPI) is an important antigen for ANCA in vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 99, 1995, 49-56.
18. Halbwachs-Mercarelli L., Nusbaum P., Noël L.H., Reumaux D., Erlinger S., Grünfeld J.P., Lesavre P.: ANCA directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 1992, 79-84.
19. Cohen Tervaert J.W., Mulder L., Stegmann C., Elema J., Huijtema M., The H., Kallenberg C.: Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 1993, 115-120.
20. Shogh T., Peen E.: Lactoferrin, anti-lactoferrin antibodies and inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336, 1993, 533-538.
21. Zhao M., Lockwood C.M.: Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 103, 1996, 397-402.
22. 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, 1954, 789-794.
23. 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.
24. Thomas, Lothar: Labor und Diagnose, 5. Auflage 1998, 1495

* Bei diesen Artikeln bitte jeweils Nachfrage, da sie nur bedingt verfügbar sind.