



# 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](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

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

Gebrauchsinformation

**BIOGNOST® AKA IgG NACHWEIS**

INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZTEST zum Nachweis von IgG ANTIKÖRPERN gegen KERATIN (AKA) auf RATTENSPEISERÖHRE in humanem Serum

Testkit für 48 IgG Bestimmungen, Best.Nr. 5248

Alle Reagenzien des Testkits sind auch einzeln erhältlich

Testdauer: ca. 90 min

Beim **Keratin IgG** Nachweis werden die Seren zum Screenen 1:2 oder 1:5, zum Titrieren gemäß 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 etc. oder 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 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® Keratin IgG Nachweis ist ein indirekter Immunfluoreszenztest für die qualitative und/oder semi-quantitative Bestimmung von Autoantikörpern gegen Keratin in humanem Serum. Der Biognost® Keratin IgG IFT ist zum Einsatz in der Diagnostik der rheumatoiden Arthritis bestimmt.

**EINFÜHRUNG**

Die rheumatoide Arthritis (RA) bzw. die chronische Polyarthrit (cP) ist eine Erkrankung der mesenchymalen Gewebe. Serologisch ist die rheumatoide Arthritis durch die Anwesenheit verschiedener zirkulierender Autoantikörper wie Rheumafaktoren (RF), antinukleäre Antikörper (ANA) und Antikörper gegen verschiedene Gewebsantigene wie Kollagen, glatte Muskulatur oder Intermediärfilamente (IF) charakterisiert.

Die Keratine oder Cytokeratine gehören zu den komplexesten Klassen der Intermediärfilamente. Zur Zeit sind 19 verschiedene Untereinheiten in diversen humanen Epithelien identifiziert worden. Die Intermediärfilamente, die von ihrer Größe zwischen den Mikrofilamenten und Mikrotubuli liegen, und somit am Aufbau und der Struktur des Cytoskeletts beteiligt sind, sind aus fünf Hauptkomponenten aufgebaut: Keratine, Desmine, Vimentine, Neurofilamente und GFA Proteine (glial fibrillary acidic proteins), wonach sie in fünf Klassen eingeteilt werden können. Die meisten Zellen produzieren nur eine Klasse von Intermediärfilamenten. So enthalten z.B. Epithelzellen hauptsächlich Keratin, wohingegen Zellen des mesenchymalen Gewebes (z.B. Fibroblasten) nur Vimentin produzieren.

Anti-Keratin Antikörper (AKA) wurden erstmals 1979 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beschrieben. Diese anti-Stratum corneum Antikörper (anti-SC AK) reagieren in der indirekten Immunfluoreszenz mit der keratinhaltigen Schicht (Stratum corneum) des Epithels von Rattenspeiseröhre.

Im Gegensatz zum Rheumafaktor, der bei vielen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen auftritt, sind Keratin Antikörper und, in geringerem Maße, der antiperinukleäre Faktor (APF), welcher durch die Reaktion mit perinukleären cyto-plasmatischen Einschlüssen der Epithelzellen der Mundschleimhaut nachgewiesen wird, spezifische Marker für die rheumatoide Arthritis.

Im Vergleich zum APF sind Keratin Antikörper jedoch die spezifischeren Marker der RA und als diagnostischer Test für rheumatoide Arthritis am besten geeignet, was durch eine Vielzahl von Studien bestätigt wurde. Dabei zeigte sich, dass Gewebe-schnitte von Rattenspeiseröhren, wie sie im vorliegenden Test als Substrat eingesetzt werden, im Vergleich zu Speiseröhrenschnitten anderer Spezies wie Maus oder Affe sowie im Vergleich zu humaner Epidermis überlegen und damit das optimale Substrat zum Nachweis von Keratin Antikörpern sind.

Im indirekten Immunfluoreszenztest zeigen 39%-59% der Patienten mit rheumatoider Arthritis AKA positive Ergebnisse. Gelegentlich wurden Keratin Antikörper auch bei anderen systemischen rheumatoiden Krankheiten und nur selten (0%-3%) bei Seren gesunder Personen gefunden. Ein Vergleich des Auftretens von Keratin Antikörpern der IgG und IgM Klasse bei rheumatoider Arthritis zeigte sich, dass nur der IgG Nachweis eine hohe spezifische Reaktivität (98%) besitzt. Desweiteren besteht ein Zusammenhang zwischen Keratin IgG Antikörpern und einer gesteigerten Erythrozyten-sedimentationsrate (ESR), einer erhöhten Konzentration von C reaktiven Proteinen und zirkulierenden Immunkomplexen.

Die diagnostische Sensitivität der IgG AKA Erkennung liegt bei 59%, die Spezifität bei nahezu 98%. Daher muss der Keratin IgG Antikörper-Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz als ein wichtiger Test für die Diagnose von rheumatoider Arthritis angesehen werden. Da die Bildung von Keratin Antikörpern meist der klinischen Symptomatik der rheumatoiden Arthritis vorausgeht, ist der AKA IFT ein geeigneter Nachweis für die Frühdiagnose.

**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 DES TESTKITS UND SONSTIGER TESTREAGENZIEN****1. TESTKIT**

Best.Nr. 5248: Biognost® Keratin IgG IFT; 48 Bestimmungen; 12 Objektträger mit 4 Auftragstellen; 0,2 ml positive Kontrolle; 0,5 ml Autoantikörper negative Kontrolle; 2 ml IgG Konjugat; 1,5 ml Einschlussmedium; 2x 10 g PBS Puffer Festsubstanz; 15 Deckgläser; Gebrauchsinformation.

**Bitte beachten:** Der Kit ist nicht immer verfügbar.**2. EINZELREAGENZIEN****2a. Objektträger:**

Best.Nr. 5204: Biognost® Rattenspeiseröhre Objektträger; beschichtet mit Kryostatschnitten von der Rattenspeiseröhre; 4 Auftragstellen.

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

**2b. Positive Kontrolle:**

Best.Nr. 5201: Biognost® Keratin IgG positive Kontrolle; stabilisiertes Humanserum, enthält IgG Antikörper gegen Keratin, 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. 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.

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.

**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. 1704 bzw. Best.Nr. 17604: Biognost® Saugpapierschablonen für Objektträger mit 4 Auftragsstellen; 12 Stück bzw. 60 Stück.

Best.Nr. 1700 bzw. Best.Nr. 17100: Biognost® Deckgläser; 15 Stück bzw. 100 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.

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.

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

## 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 ( $\pm 1$  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 Patientenseren 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 Patientenseren auf die Auftragstellen tropfen (flächendeckend, je nach Größe der Auftragstelle ca. 15-50  $\mu$ l).
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  $\mu$ l). Ein Tropfen aus Biognost® Konjugatflaschen entspricht ca. 25  $\mu$ l.
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  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  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 Epithelschicht (Stratum corneum) der Rattenspeiseröhre 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 Keratin positiv beurteilt, wenn mindestens eine 1+ Fluoreszenz der Epithelschicht (Stratum corneum) der Rattenspeiseröhre als linienförmige lamellare Struktur zu sehen ist.

Fluoreszenzen anderer Gewebestandteile als der jeweiligen Zielstrukturen (z.B. Zellkerne) werden als negativ in Bezug auf den jeweiligen Parameter bewertet; sie können jedoch auf das Vorliegen anderer Autoantikörper hindeuten. Zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss eines solchen Verdachts sollten entsprechende Seren auf den jeweiligen Referenzsubstraten untersucht werden.

### 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.

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

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® Keratin IgG IFT folgende Referenzbereiche ermittelt.

### Keratin IgG

Anzahl der Blutspender: 141

Referenzbereich (Titerbereich): <2 - 5

Messwerte oberhalb des Referenzbereiches: 3

Mittlerer Durchseuchungstiter: 1

Serumverdünnung für Screening (Vorschlag): 1:2 oder 1:5

### 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® Keratin IgG IFT 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“.

### Keratin IgG

Anzahl der Patienten: 14

Messergebnisse (Titer): 64 - 320

Messwerte unterhalb des positiven Messbereiches: 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® Keratin IgG IFT ergibt sich eine Sensitivität von 100%.

Beim Biognost® Keratin IFT kann bei Vorliegen entsprechender Symptome jede spezifische Fluoreszenz auf eine Erkrankung hindeuten. Gegebenenfalls sollte das Serum auch noch unverdünnt untersucht werden.

Bei der Untersuchung von 34 Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde ein mittlerer Titer von 52 (Einzeltiter zwischen < 5 und 320) erhalten.

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. Youinou P., Serre G.: The Antiperinuclear Factor and Antikeratin Antibody Systems. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 1995, 508-518.
2. Johnson G.D., Carvalho A., Hobarow E.J., Goddard D.H., Russel G.: Antiperinuclear factor and keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 40, 1981, 263-266.
3. Young B.J.J., Mallya R.K., Leslie R.D.J., Clark C.J.M., Hamblin T.J.: Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* 2, 1979, 97-99.
4. Aho K., Palusuo T., Kurki P.: Marker Antibodies of Rheumatoid Arthritis: Diagnostic and Pathogenetic Implications. *Sem. Arthr. Rheum.* 23, 1994, 379-387.
5. Vincent C., Serre G., Lapeyre F., Fourni B., Ayrolles C., Fourni A., Soleilhavoup J.-P.: High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called antikeratin antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 1989, 712-722.
6. Ordeig J., Guardia J.: Diagnostic Value of Antikeratin Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatology* 11, 1984, 602-604.
7. Quismorio F.P., Kaufman R.L., Beardmore T., Mongan E.S.: Reactivity of Serum Antibodies to the Keratin Layer of Rat Esophagus in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheum.* 26, 1983, 494-499.
8. Vincent C., Serre G., Lapeyre F., Fourni B., Ayrolles C., Fourni A., Soleilhavoup J.-P.: Natural IgG to epidermal cytokeratins vs IgG to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called Antikeratin Antibodies, in Rheumatoid Arthritis and other Rheumatic Diseases. *J. Autoimmunity* 4, 1991, 493-505.
9. Paimela L., Gripenberg M., Kurki P., Leirisalo-Repo M.: Antikeratin antibodies: Diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 1992, 743-746.
10. Kurki P., Aho K., Palusuo T., Heliövaara M.: Immunopathology of Rheumatoid Arthritis. *Arthr. Rheum.* 35, 1992, 914-917.
11. Serre G., Vincent C., Viraben R., Soleilhavoup J.-P.: Natural IgM and IgG Autoantibodies to Epidermal Keratins in Normal Human Sera. I: ELISA-Titration, Immunofluorescence Study. *J. Invest. Dermatol.* 88, 1987, 21-24.
12. Scott D.L., Delamere J.P., Jones L.J., Walton K.W.: Significance of laminar antikeratin antibodies to rat oesophagus in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 40, 1981, 267-271.
13. 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.
14. 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.
15. Bios® Laboratorien, eigene Ergebnisse, Publikation in Vorbereitung.
16. Thomas, Lothar: Labor und Diagnose, 5. Auflage 1998, 1495.

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