Immunfluoreszenz Diagnostik auf HEp2 Zellen

Der Nachweis von Anti-Nukleären-Antikörpern (ANA)

Philipp von Landenberg

Johannes Gutenberg Universität Mainz
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Antinukleäre Antikörper

Entzündliche Systemerkrankungen

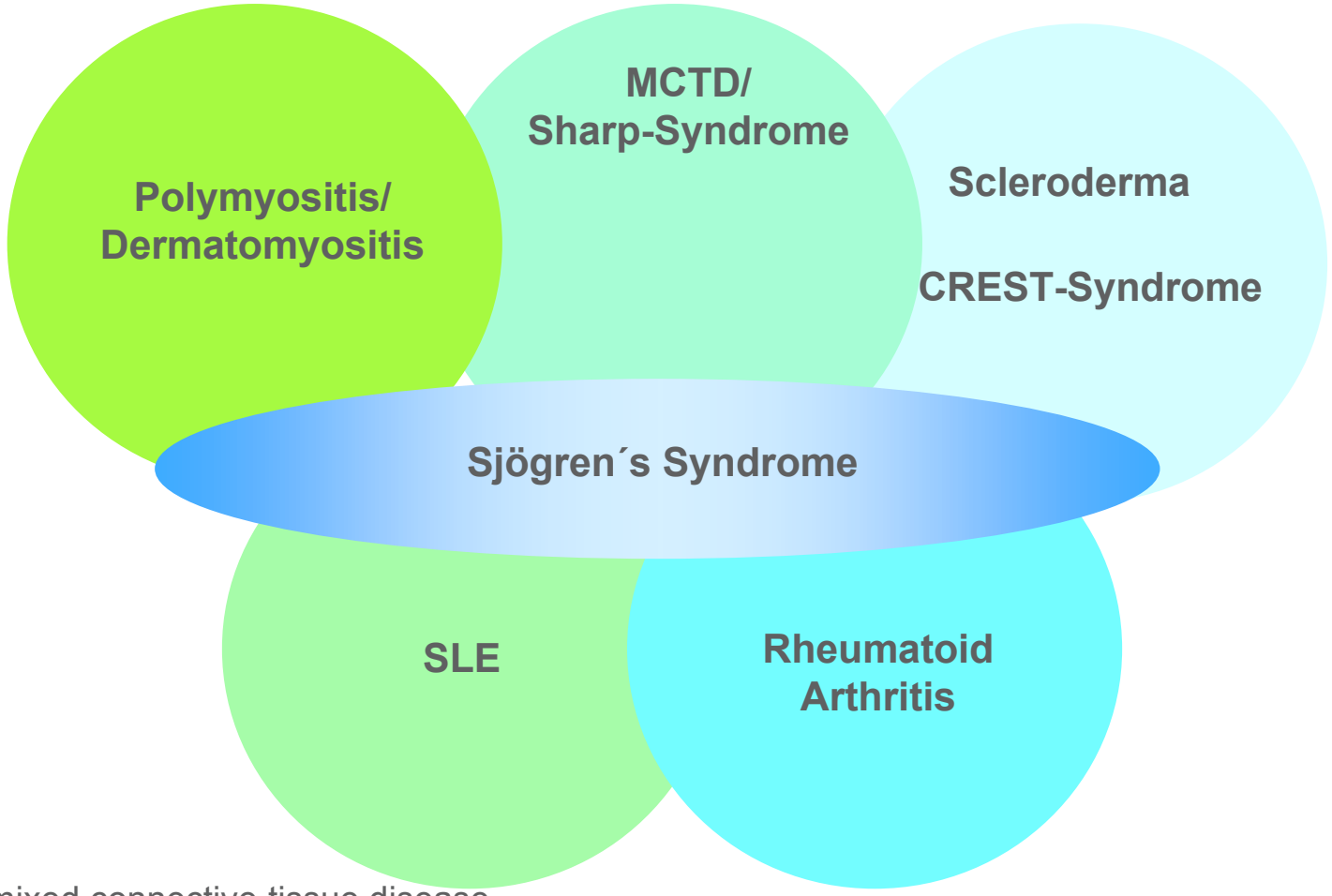
Synonym:
Connective tissue disease / Inflammatory Rheumatic Disease

Erkrankungen mit meist unbekannter Genese

- **Fehlfunktion von zellulärer und humoraler Immunität**
- **Systemerkrankungen mit Beteiligung nahezu aller Organe**
- **Chronischer Verlauf der Erkrakungen**
- **Entzündung und Zerstörung des Bindegewebes**
- **„Overlap“ Syndrome**
  Die Identifizierung / Klassifizierung einer einzelnen Erkrankung kann extrem schwierig sein

Antinukleäre Antikörper

"Overlap" rheumatischer Erkrankungen



MCTD: mixed connective tissue disease

Antinukleäre Antikörper

Entzündliche Systemerkrankungen

Trotz der erheblichen Unterschiede dieser Erkrankungen, haben sie eine große Gemeinsamkeit

Zirkulierende Serum Autoantikörper

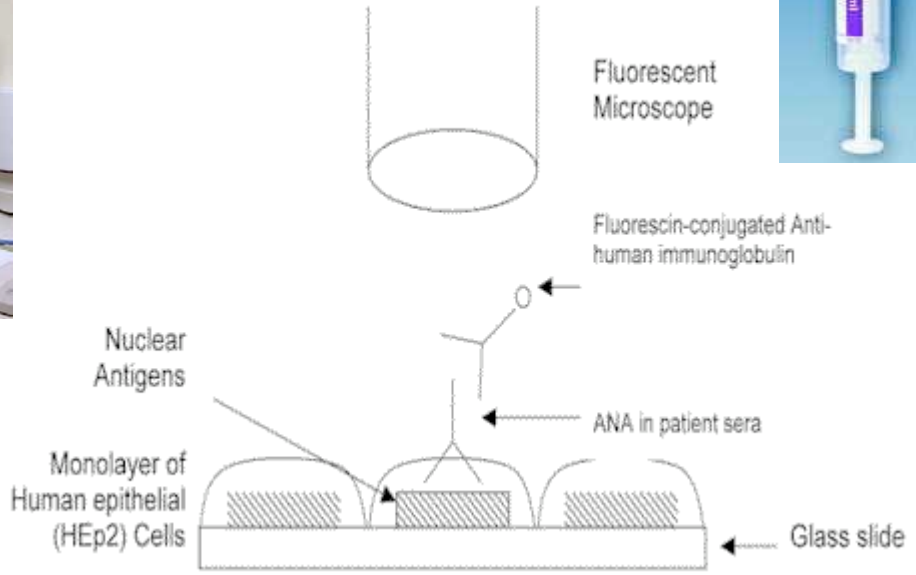
Diese Antikörper sind gegen Komponenten des Zellkerns (lat.: Nukleus), Anti-Nukleäre-Antikörper, und des Zytoplasmas gerichtet. Einige dieser Antikörper sind als sog. „Marker-Antikörper“ für die Diagnose bestimmter Erkrankungen wichtig.

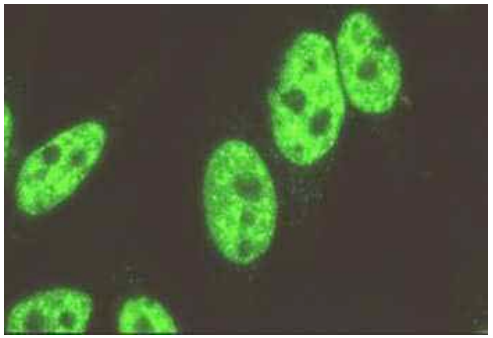
Der Nachweis dieser Autoantikörper ist somit essentiell zur Diagnose und Differentierung der verschiedenen Rheumatischen System-Erkrankungen

Antinukleäre Antikörper







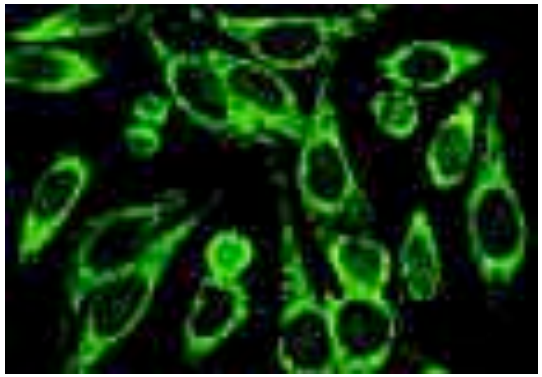


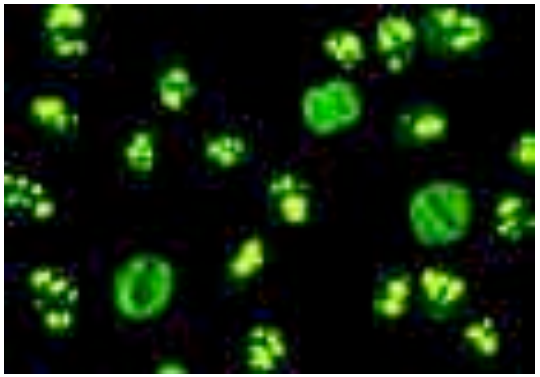


Antinukleäre Antikörper

Immunofluoreszenz Pattern auf HEp2 Zellen

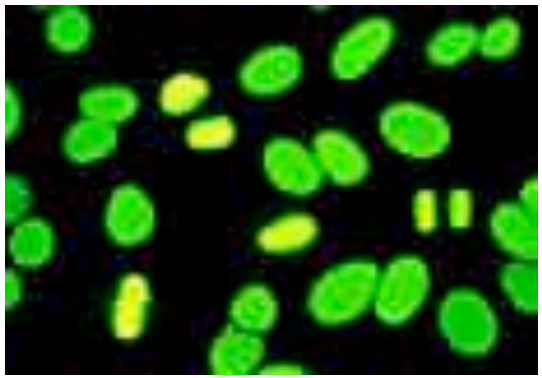
Zytoplasmatisch
z.B. anti-M2

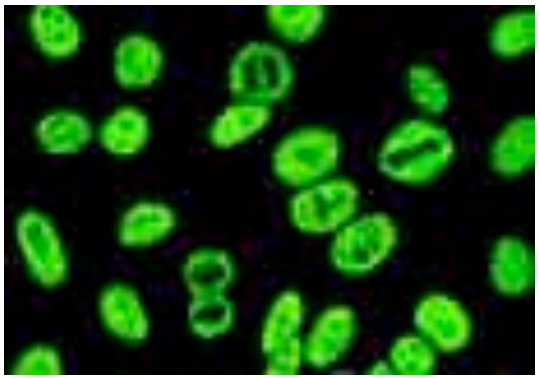




Nukleolär
z.B. anti-PM-Scl

Homogen
z.B. anti-dsDNA
z.B. anti-Histone





Granulär
z.B. anti-SS-A
z.B. anti-SS-B

Antinukleäre Antikörper

ENA: Extractable nuclear antigens (extrahierbare nukleäre Antigene)

- Eine Untergruppe der ANA: extrahiert aus nukleären Antigenen
- Ursprung dieser Antigene war ein flüssiger Extrakt aus Kalbs-Thymus
- Identifizierung von nukleären und zytoplasmatischen Zellkomponenten die Ziel von Autoantikörpern sind
- Über 100 verschiedene Antigene sind bis jetzt beschrieben worden, von denen aber nur 6 relevant für die Routine sind.

Diese werden üblicherweise bezeichnet als **ENA**: Sm

U1-sn-RNP

SS-A (Ro)

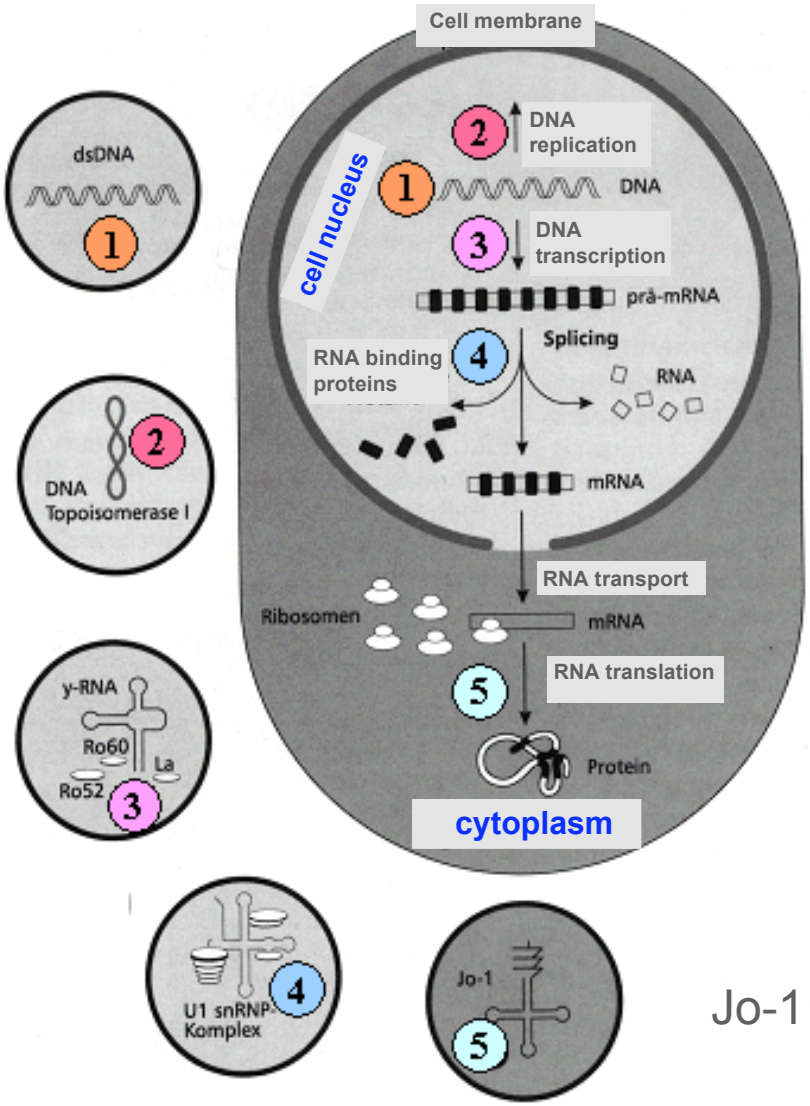
SS-B (La)

Scl 70

Jo-1

Antinukleäre Antikörper

ENA



Scl-70

SS-A (Ro)
SS-B (La)

Sm
U1-snRNP

Jo-1

Qualitätskontrolle

Technisch Korrekte Durchführung von Immunfluoreszenz Testen

Qualitätskontrolle

Fehlersuche und Behebung

Qualitätskontrolle

...Durchführung des Test´s

- **Sauberer Arbeitsplatz !**
- **Objektträger sollten Raumtemperatur erreicht haben**
- **Objektträger sollten an der Oberseite mit einem wasserfesten Stift markiert werden**
- **Die Markierung sollte im Bereich der Griff-Fläche erfolgen**
- **Das Gewebe bzw. die Zellen dürfen nicht berührt werden**

Qualitätskontrolle

...Verwendung von Seren / Konjugat / Waschlösung / Eindeckmedium

- **Der korrekte Verdünnungspuffer (+/- Tween) sollte verwendet werden**
- **Das korrekte Volumen sollte auf die Auftragsstelle aufgetragen werden → Benetzung der gesamten Auftragsstelle → SOP !**
- **Keine Luftblasen bei Serum / Konjugat-auftrag**
- **Korrekte Einhaltung der Inkubationszeiten**
- **Vor dem Waschen in der Küvette sollten die Auftragsstellen abgespült werden**
- **Es sollte immer frisches Konjugat verwendet werden**
- **Die Menge des Eindeckmediums sollte einmal pro Auftragsstelle festgelegt werden → SOP !**

Qualitätskontrolle

...Wasch-Schritte

- **Nach dem Waschen der Objektträger in der Küvette sollten diese nur auf der Rückseite getrocknet werden**
- **Der Zwischenraum zwischen den Auftragsstellen sollte nicht getrocknet werden**
- **Die Auftragsstellen sollten vor dem nächsten Inkubationsschritt nicht vollständig austrocknen**

Qualitätskontrolle

...Mikroskopie

- **Mikroskop in einem dunklen Raum**
- **Verwendung der korrekten Filter und Objektive**

z.B. HEp-2 Zelle Beurteilung ob positiv / negativ bei 200-facher Vergrößerung

Beurteilung welches Muster bei 400-facher Vergrößerung

- **Verwendung einer korrekt eingestellten und gewarteten Lampe (max. 150 h)**
- **Verwendung einer Lampe mit mind. 50 W oder vergleichbares LED System**

Qualitätskontrolle

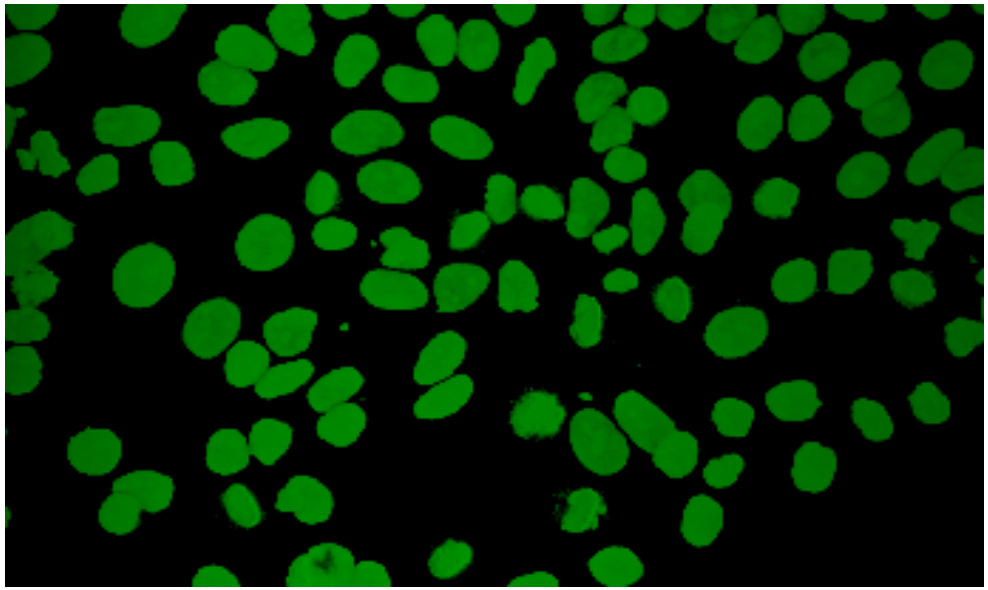
…..auch ein Mikroskop……



Qualitätskontrolle



Qualitätskontrolle



Was ist die „Wahrheit“ ?

Qualitätskontrolle

Qualitätskontrolle von Immunfluoreszenz Schnitten ?

Überhaupt möglich ?

Wie ?

Wie oft ?

Qualitätskontrolle

Postitiv / Negativ Kontrolle

1. Hat die Methode korrekt funktioniert ?
2. Gibt es unspezifische Bindungen ?
3. Ist die Intensität der Positiv Kontrolle unverändert ?

Qualitätskontrolle

Titrierbare Kontrolle

1. Gibt es Schwankungen von Charge zu Charge ?

2. Dokumentation der Vergleichbarkeit von Ergebnissen bei einzelnen Patienten → Akkreditierung

Qualitätskontrolle

Musterkontrollen

1. Sind alle relevanten Muster auf der HEp2-Zelle vorhanden ?

2. Sind die Muster von Charge zu Charge in der selben Intensität vorhanden ?

3. Kontrolle auch seltener / empfindlicher Muster empfohlen (Aktin , SSA, etc.)

Qualitätskontrolle

HEp-2 Zellen

Kontrollen:

Auf dem ersten Objektträger Positiv- und Negativ-Kontrolle (z.B. homogen 1:640)

Titrierbare Kontrolle verwenden (z.B. 1 x pro Monat und bei Chargenwechsel) entweder eigener Serum Pool oder kommerziell erhältliches Serum

Muster Kontrollen (eigener Serum Pool) versch. Muster testen, z.B. Actin, Jo-1. Muster Kontrollen können ja nach Einsender-Spektrum variieren.

Chargenkontrollen

Unbedingt vor neuer Charge versch. Chargen testen ! Es handelt sich um lebende Zellen die in der Zellkultur wachsen: hier kann es leicht zu Unterschieden von Charge zu Charge kommen.

Wenn möglich Chargenreservierungen vornehmen um zu große Variationen zu verhindern

Qualitätskontrolle

HEp-2 Zellen

Zellbild:

Sind ausreichend Mitosen in einem Gesichtsfeld zu sehen ?

Liegen die Zellen nicht zu dicht, bzw. sind ausreichend Zellen zu sehen ?

„Ghost-Cells“ Zellen ohne Zellkern ?

Qualitätskontrolle

Ausblick…

Muster Kontrollen der DGKL

→ Ersatz der CDC Seren

→ Kostenfrei über die DGKL zu beziehen

→ 2 mal im Jahr verschickt

→ Garantierte Stabilität über viel Jahre

Qualität…?

Weitere Wege zur Steigerung der Qualität ?!?

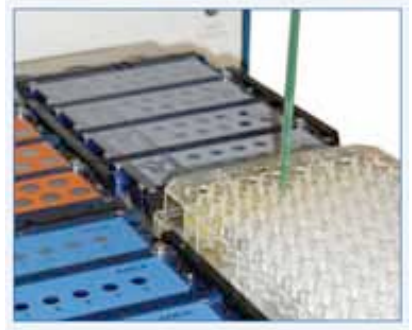
Automatisierung

…der HEp2 Zell Präparation und Beurteilung….

Automatisierung….







Was können die Systeme ??

Automatisches Verdünnen der Seren…
Automatisches Pipettieren der Objektträger…
Automatisches Waschen…

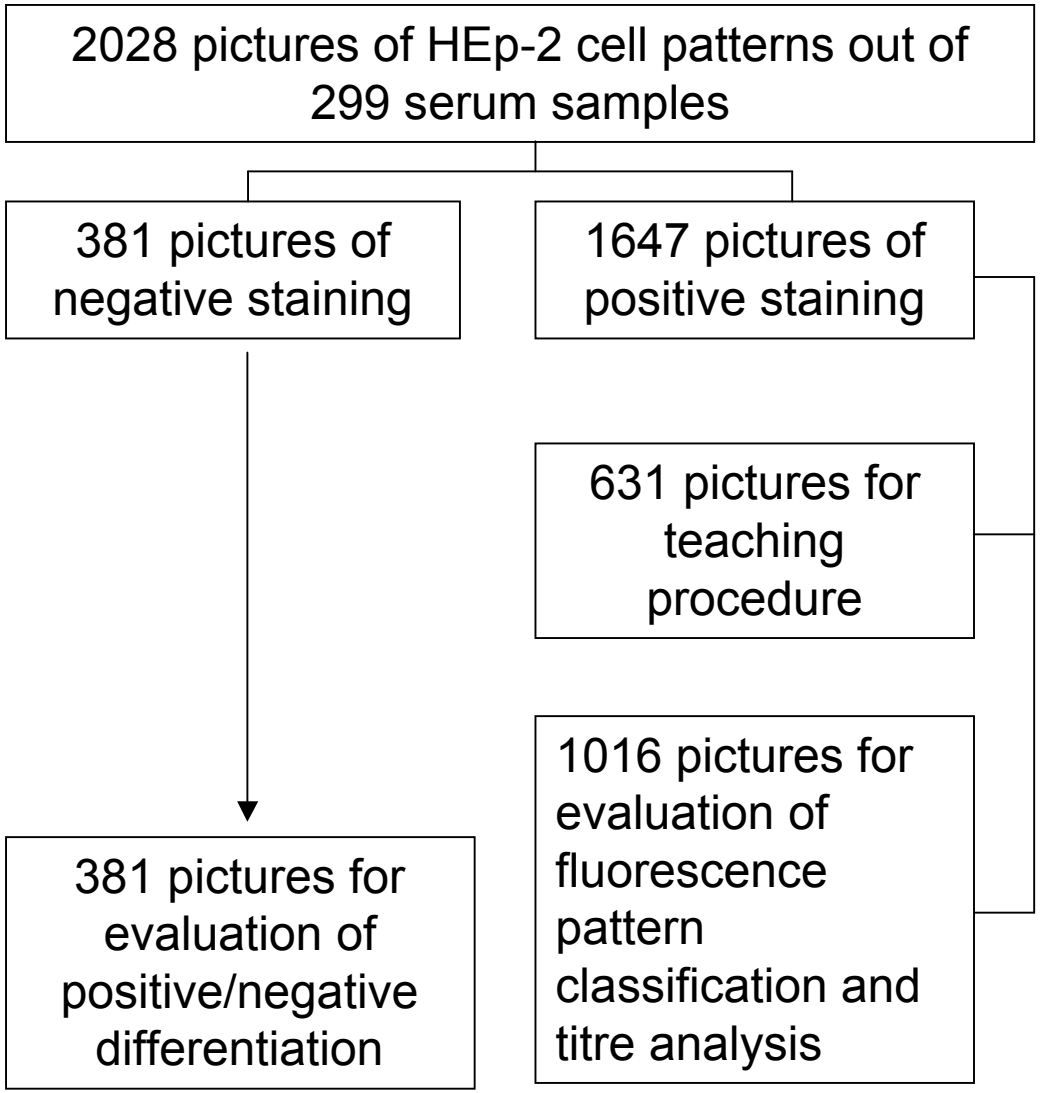
Eindecken per Hand…

METHODS & MATERIALS

1. Picture acquisition

2. Teaching process for IIF pattern analysis

3. Evaluation process

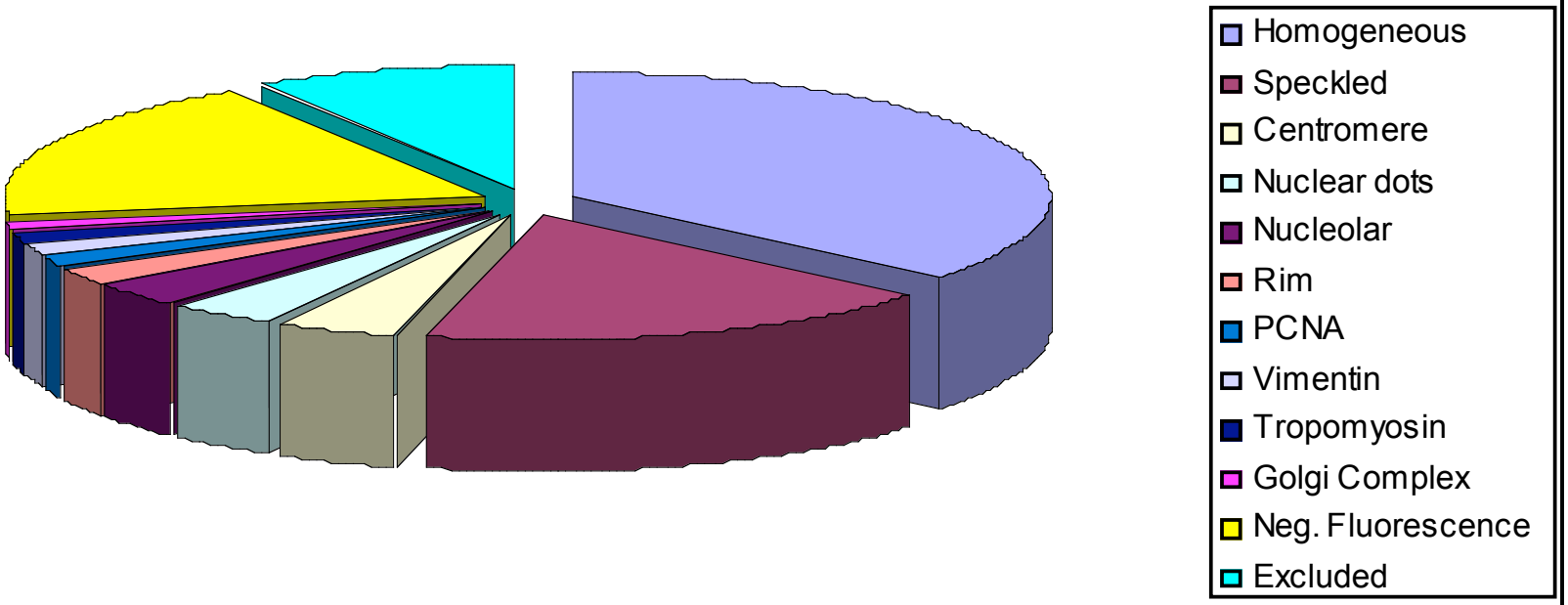


RESULTS (1): Positive / Negative differentiation

	n	1	2	2	
	p	1	3	3	0
	total	3	0		

RESULTS (2): Pattern classification

Frequencies of all IF patterns found in manual evaluation (n=2028)

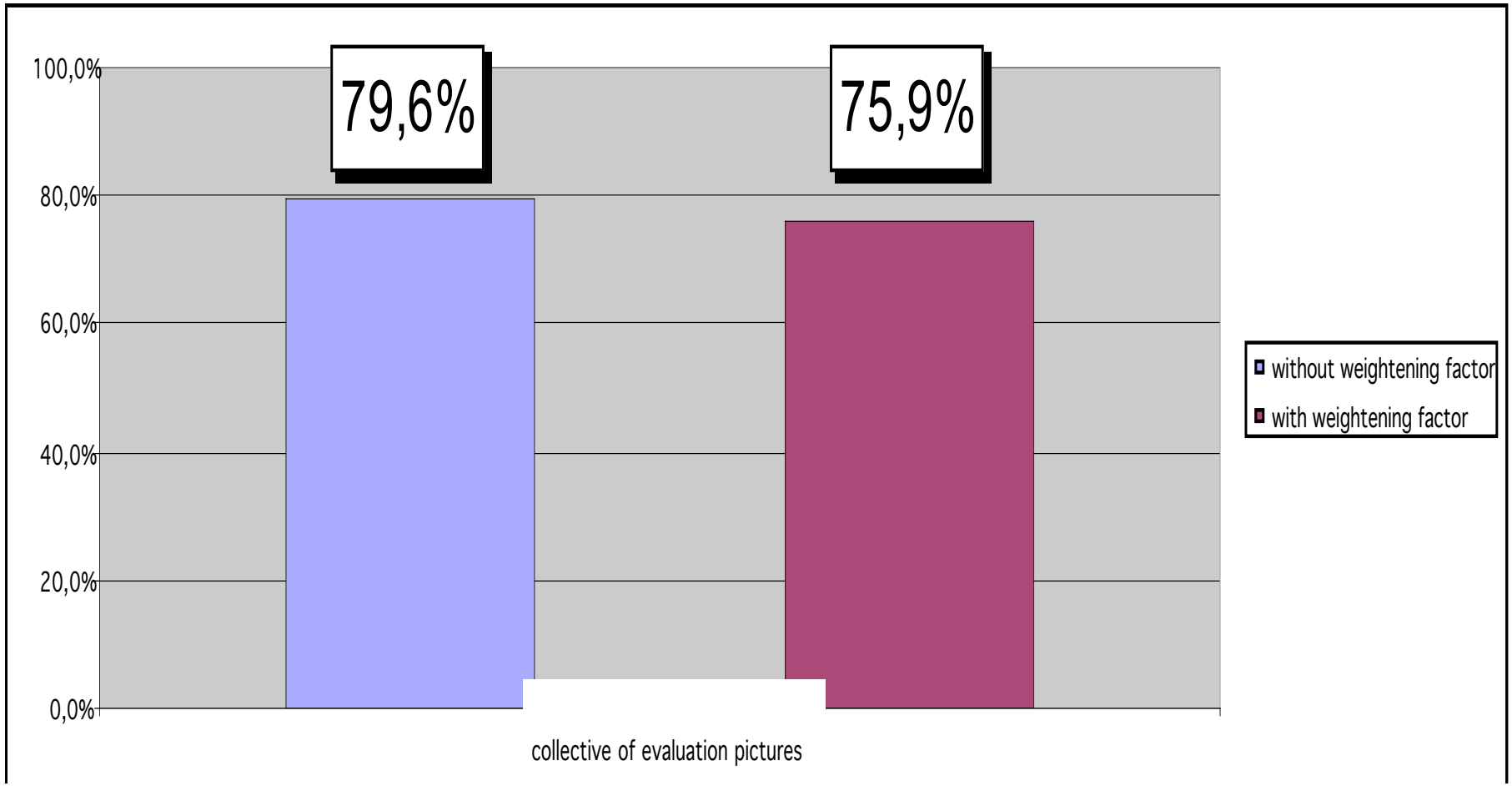


RESULTS (2): Pattern classification

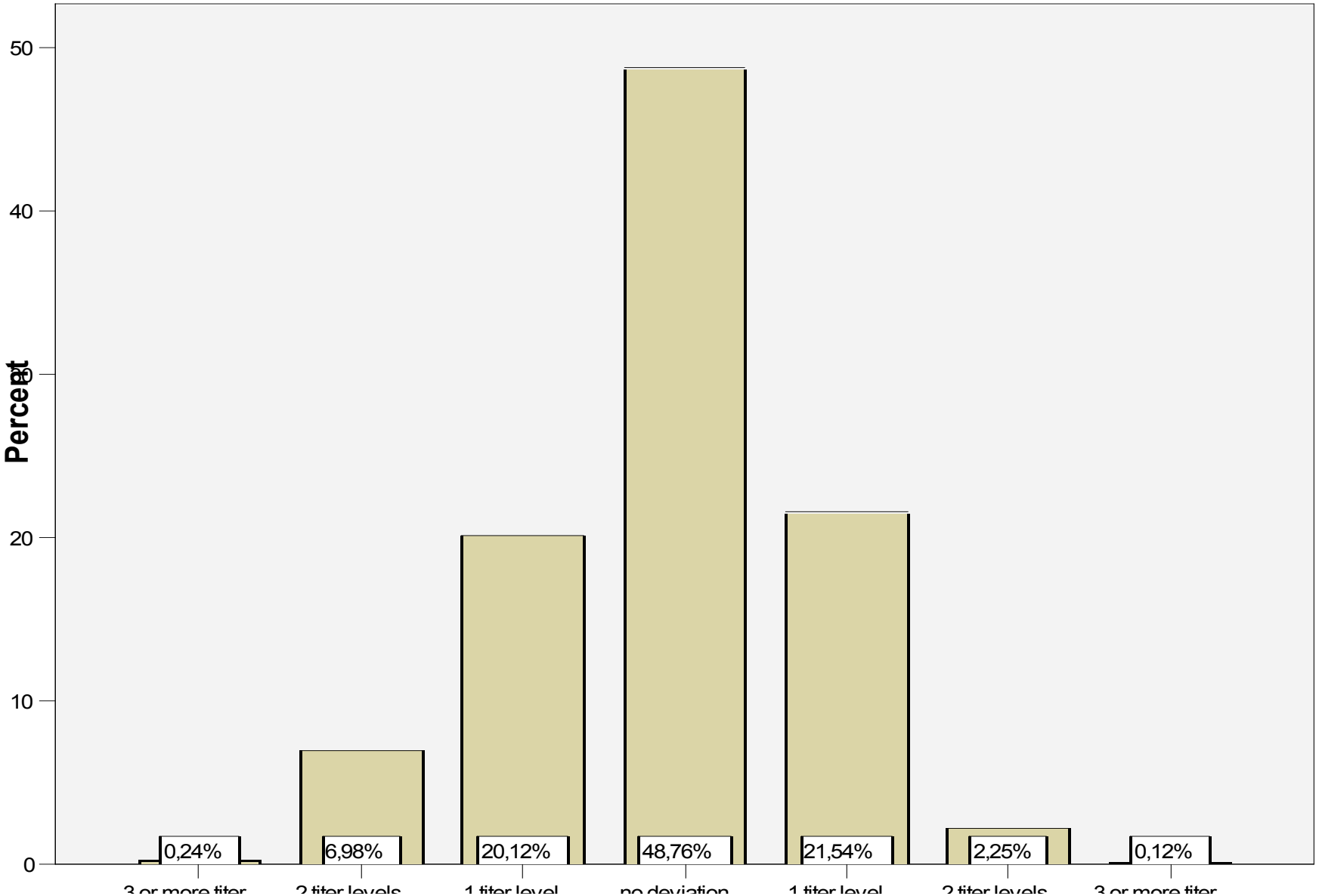
IIF pattern classification: manual vs. automated pattern classification

			homogeneous	speckled	centromere	nucleolar	rim	PCNA	vimentin	nuclear dots	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	2	1	2	1	1	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	1	1	2	2	5	2	[illegible]
	c	[illegible]	0	0	[illegible]	0	0	2	0	2	[illegible]
	n	[illegible]	4	4	0	[illegible]	0	5	1	0	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	0	4	0	3	0	3	0	[illegible]	[illegible]
[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	8	[illegible]	3	4	7	8	[illegible]

RESULTS (2): Correct pattern classification



RESULTS (III): Computer-analyzed ANA titer



SUMMARY

- Automated identification of negative HEp-2 cell fluorescence patterns was possible in 99,7%.
- pattern analysis was found in 75,9% (weightened rate).
- 90,4% of the software-analysed titer values were located in the expected range.

Zusammenfassung

1. Standardisierung der Methodik 
2. Standardisierung der Beurteilung
3. Automatisierung der Präparation 
4. Automatisierung der Beurteilung

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit