

## **RELISA® ANA ANTIKÖRPER-SCREENING-TEST**

**Nur zur In Vitro-Diagnostik**

**Für Professionellen Gebrauch**

**Katalognummer: 7096-11 (96 Kavitäten) und 7696-11 (576 Kavitäten)**

*INDIKATION: Dies ist ein indirektes Enzym-Immuno-Testsystem für den Nachweis von antinukleären Antikörpern in humanem Serum. Der Test dient als Hilfestellung beim Nachweis von Antikörpern, die mit systemischen rheumatischen Erkrankungen assoziiert werden.*

### **ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS**

Der Terminus antinukleäre Antikörper (ANA) ist ein Oberbegriff zur Beschreibung von Autoantikörpern gegen verschiedene Zellkernproteine. Frühere Studien dieser Autoantikörper, die mit Immunofluoreszenztechniken arbeiteten, haben einige wenige Spezifitäten von Zellkernproteinen aufgezeigt (1). Wegen der hohen Korrelation positiver ANA mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) ist diese Erkrankung bei negativen ANA grundsätzlich auszuschließen (2).

Auch wenn DNA-spezifische Antikörper weiterhin eine hohe Korrelation mit SLE (3) aufweisen, wurde eine Reihe nukleärer (4) und zytoplasmischer (5-7) Makromoleküle nachgewiesen und mit anderen Bindegewebserkrankungen in Verbindung gebracht (8-10). Einige dieser Antikörper haben offenbar einen diagnostischen und/oder prognostischen Wert bei progressiver systemischer Sklerose (11-12), gemischter Bindegewebskrankheit (13-15), Sjögren-Syndrom (16-17), Polymyositis (18) und/oder rheumatoider Arthritis (19). Aus diesem Grunde werden ANA Tests mittlerweile als allgemeine Screening-Methode zum Nachweis von Bindegewebskrankheit anerkannt (20).

Die am häufigsten angewendete Methode für ANA-Tests ist die indirekte Fluoreszenz-Antikörper (IFA) unter Verwendung von Zellkulturen. Die Sensitivität dieser Tests hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Art des verwendeten Substrats, Fixierungsverfahren und den im Serum vorhandenen ANA-Typen. Der IFA-Test mit HEp-2 oder HEp-2000® Zellen wird als sensitiver Test für den Nachweis von ANA angesehen; er ist jedoch arbeitsaufwändig und aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz-Mikroskope fehleranfällig und nicht leicht zu interpretieren.

Enzym-Immunoassays (EIA) sind eine Alternative zur IFA-Methode. Mit EIA-Testsystemen ist das effiziente Screening großer Mengen von Proben möglich. Menschliche Fehler werden reduziert und objektive Ergebnisse erzielt. Von den EIA-Methoden wurde allerdings berichtet, dass sie im Vergleich zu IFA-Methoden falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse liefern (21).

### **TESTPRINZIP**

Dieser Test ist ein qualitativer, indirekter Enzym-Immuntest. Stabilisierte Antigene (dsDNA, Histone, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, Zentromere, PCNA, Ribosomal P, M2 und andere vom HEp-2 Nukleus und Zytoplasma extrahierte Antigene) wurden auf die Oberfläche der Mikrotiterplatten aufgetragen, um in diesem System als Antigen-Substrat zu fungieren. Verdünnte Patientenproben werden in die Kavitäten gegeben und inkubiert, so dass in der Probe vorhandene spezifische Antikörper mit dem gebundenen Antigen in der Festphase reagieren können. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden abgewaschen und anschließend werden die Kavitäten mit antihumanen Antikörpern (Ziege) inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind. Das im Testsystem enthaltene an Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper-Präparat ist spezifisch für schwere und leichte Ketten von humanem IgG.

Nach der Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-Konjugat wird in positiven Proben ein stabiler dreiteiliger Komplex gebildet.

Dieser Komplex besteht aus einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-humanen Antikörper, gebunden an einen humanen antinukleären Antikörper, der wiederum an das auf der Plastikoberfläche stabilisierte Antigen gebunden ist.

Nach einem weiteren Waschvorgang wird dieser Komplex durch Addition einer Lösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als chromogenes Substrat nachgewiesen. Der Grad der Farbentwicklung in den Kavitäten ist proportional zur Konzentration der antinukleären Antikörper in den Serumproben. Jede Kavität wird in einem Spektrophotometer bei 450 nm ausgewertet.

## SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

**Aufbewahrung:** Sämtliche Komponenten sollten bei 2-10°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Nicht einfrieren.

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

### REAKTIVE REAGENZIEN

**Mit RELISA® Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen [PLATE]:** Katalognummer 7008-11. Ein Mikrotiterplattenrahmen mit zwölf Streifen aus acht Brunnen mit zellulären Antigenen beschichtet (dsDNA, Histone, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, Zentromere, PCNA, Ribosomal P, M2 und andere vom HEp-2 Nukleus und Zytoplasma extrahierte Antigene). Diese Streifen sind dunkelblau farbcodiert. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden, können einzelne Kavitäten abgetrennt werden. Unbenutzte Streifen können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

**RELISA® Probenverdünner [SOLN|DIL]:** Katalognummer 7100 (100 ml). Spezieller gepufferter Probenverdünner zur Verdünnung der Patientenproben.

**RELISA® Enzym-Antikörper-Reagens - spezifisch für schwere und leichte Ketten aus Human-IgG [CONJ|HRP]:** Katalognummer 7009-11 (14 ml). Anti-Human-IgG (H&L), an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens.

**RELISA® Substratlösung [SOLN|SUB]**   : Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-spezifische Enzymsubstratlösung, enthält stabilisiertes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Gebrauchsfertiges Reagens. **GEFAHR:** Entzündlich. Dieses Reagenz enthält weniger als 25% Methanol und Azeton. Es darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. Bei Kontakt mit den Augen sofort gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.

**RELISA® Stoppreagens [SOLN|STOP]**   : Katalognummer 7033 (14 ml). Spezielle Stopplösung für EIA-Testsysteme von Immuno Concepts. Gebrauchsfertiges Reagens. **GEFAHR:** Korrosiv. Dieses Reagens enthält Chlorwasserstoff- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

**RELISA® ANA Kalibratorserum [CAL]:** Katalognummer 7026-11 (2 ml). Humanserum, enthält antinukleäre Antikörper. Der Testwert für dieses Serum ist auf dem Flaschenetikett eingetragen. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

**RELISA® ANA Positivkontrolle [CONTROL|+]:** Katalognummer 7021-11 (2 ml). Human-Positivkontrollserum, enthält antinukleäre Antikörper. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

**RELISA® ANA Negativkontrolle [CONTROL|-]:** Katalognummer 7031 (2 ml). Human-Negativkontrollserum, enthält keine antinukleären Antikörper. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

**RELISA® Optionale unverdünnte ANA-Positivkontrolle [OPT+]:** Katalognummer 7022-11 (0,25 ml). Human-Positivkontrollserum, enthält antinukleäre Antikörper. Diese Positivkontrolle ist wie ein unverdünntes Serum zu behandeln.

### NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

#### Streifenhalter

#### Waschpufferlösung:

**PBS-Puffer [PWDR|PBS]:** Katalognummer 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. Zwei Beutel je 96er-Mikrotiterplatte sind im Lieferumfang des Testkits enthalten.

**Waschpufferkonzentrat **SOLN|WASH****: Katalognummer 1031 (10 ml). 5% Tween 20-Lösung zur Verwendung mit dem Waschpuffer. (Zwei Fläschchen Pufferkonzentrat je 96er-Mikrotiterplatte sind im Lieferumfang des Testkits enthalten.)

**Herstellung:** Inhalt eines Beutels mit Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Den Inhalt einer ganzen Flasche Waschpufferkonzentrat in den aufgelösten PBS-Puffer hinzugeben. Gut durchmischen und bei 2-25°C bis zu vier Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind. Waschpufferlösung muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

## ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 25-1000 µl

Spritzflasche für die Zugabe von Waschpufferlösung in die Kavitäten von Mikrotiterplatten, oder (halb)automatisches Waschsystem für Mikrotiterplatten

1-Liter-Behälter für die PBS-Waschpufferlösung

Deionisiertes oder destilliertes Wasser

Spektrophotometer für Mikrotiterplatten für Absorptionsmessungen bei 450 nm

Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen

Saugpapier oder Papierhandtücher

Mehrkanal-Pipette für bis zu 8 Kavitäten

Einmalhandschuhe

Laborstopuhr

## SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche für dieses Produkt verwendeten Materialien menschlichen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kitbestandteile wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.
7. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
8. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
9. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
10. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Während der Tests müssen die Proben in den Kavitäten der Mikrotiterplatten verbleiben.
11. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
12. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Mikrotiterstreifen und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
13. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
14. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
15. Das Stoppreagens ist korrosiv und kann Verbrennungen verursachen. Dieses Reagens enthält Chlorwasserstoff- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

# PROBENGEWINNUNG

**Probenentnahme:** Nach Möglichkeit sollten Serumproben hergestellt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-25°C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

**Störsubstanzen:** Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrowachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil diese Zustände zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

**Aufbewahrung:** Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden.

**ACHTUNG:** Wiederholtes Einfrieren/Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.

## ALLGEMEINE HINWEISE ZUM VERFAHREN

1. Vor Verwendung müssen unbedingt alle Serumproben und Kitbestandteile auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden. Ein Liter Waschpuffer benötigt mehrere Stunden, um nach Entnahme aus dem Kühlschrank auf 20°C zu kommen. Bei Inkubationstemperaturen außerhalb des hier angegebenen Bereichs können die Ergebnisse verfälscht werden. Unverbrauchte Proben und Kitmaterialien müssen nach Verwendung wieder gekühlt werden.
2. Reagenzien vor dem Test durch vorsichtiges Umdrehen der Flasche gut durchmischen. Auf keinen Fall schütteln oder auf einen Mischer stellen. Schaumbildung vermeiden.
3. Beim Herstellen der Probenverdünnungen müssen die Pipettenspitzen vor der Zugabe von Serum in den Probenverdünner abgewischt werden. Außen an der Pipette anhaftendes überschüssiges Probenmaterial kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette wird empfohlen, weil dadurch die Zugabe, die Inkubationszeit und die Reaktionszeit gleichmäßiger ausfallen.
5. **Sorgfältiges Waschen der Kavitäten ist von entscheidender Bedeutung.** Unzureichendes Waschen der Kavitäten führt zu hohen Hintergrundwerten und unter Umständen zu falsch-positiven Ergebnissen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavitäten aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Die Platten umdrehen und in der Luft kräftig ausschlagen, um alle Waschlösung aus den Kavitäten zu entfernen. Der Waschvorgang mit Füllen und Entfernen muss drei bis fünf Mal wiederholt werden. Danach die Platten auf einem Papierhandtuch oder vergleichbarem Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird. Die Verwendung eines automatischen Waschgeräts für Mikrotiterplatten wird empfohlen, weil dies zu gleichmäßigeren Waschergebnissen führt.  
**HINWEIS:** Auf Grund der verschiedenen Waschtechniken und Automatiksysteme muss die Anzahl der Waschgänge evtl. angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Jedes Labor muss für sein Waschsystem die Anzahl von Waschgängen mit der höchsten Effizienz selbst bestimmen.
6. Unzureichende Entfernung von Waschpufferrückständen kann zu inkonsistenter Farbentwicklung führen. Die Mikrotiterstreifen sollten auf Papierhandtüchern oder vergleichbarem Material ausgelegt werden, um Waschpufferrückstände zu minimieren.
7. Die bei den Inkubationsschritten angegebene Zeitdauer muss unbedingt eingehalten werden. Alle Serumproben müssen vor Versuchsbeginn verdünnt und möglichst schnell hintereinander (in maximal fünf Minuten) in die Kavitäten dispensiert werden. Die Testserien dürfen nur so groß sein, dass diese Zeit bequem eingehalten werden kann. Die Verwendung einer mehrkanaligen Pipette zur leichteren Handhabung von Proben und Reagenzien ist zu empfehlen.
8. Mit Ausnahme des letzten Inkubationsschritts (Substratlösung) beginnt jede Inkubationsperiode nach beendeter Proben- oder Reagenzienzugabe. Die Inkubation mit Substratlösung muss für jede Kavität genau 30 Minuten dauern. Daher müssen Proben und Reagenzien in derselben Reihenfolge und im selben zeitlichen Abstand zugegeben werden.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

### BERECHNUNGEN

1. Den Absorptionswert der Leerkavität von den Absorptionswerten des Kalibrators, der Kontrollseren und Patientenproben abziehen. Den mittleren Absorptionswert von Doppelbestimmungen ermitteln.

- Die spezifische Antikörperkonzentration des Kalibratorserums (auf dem Etikett vermerkt) wird durch den mittleren Absorptionswert der Kalibratorkavitäten dividiert, um den Konvertierungsfaktor zu ermitteln.
- Die Absorptionswerte jeder Probe werden mit dem Konvertierungsfaktor multipliziert, um die spezifische Antikörperkonzentration zu ermitteln.
- Die Formel für diese Berechnung lässt sich vereinfacht wie folgt ausdrücken:

$$\frac{U_c \times \lambda_s}{\lambda_c} = U_s$$

$U_c$  = Kalibratorwert (Einheiten)

$\lambda_c$  = Absorption des Kalibrators\*

$\lambda_s$  = Probenabsorption\*

$U_s$  = Einheitswert für Probenabsorption des Kalibrators

\*Wenn Kalibratoren und Proben doppelt ermittelt werden, ist die durchschnittliche Absorption beider Kavitäten zu verwenden.

## QUALITÄTSSICHERUNG

- Der mittlere Absorptionswert der Kalibratorkavitäten muss bei mindestens 0,400 liegen. Absorptionswerte kleiner als 0,400 lassen auf unzureichende Farbentwicklung schließen und sollten nicht gewertet werden. Unzureichende Farbentwicklung ist in der Regel auf die Verwendung kalter Reagenzien oder falsches Timing bei einem oder mehreren Schritten des Assays zurückzuführen. Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25°C) erwärmen lassen und den Lauf wiederholen, wobei besonderes Augenmerk auf den zeitlichen Ablauf der einzelnen Schritte zu legen ist.
- Die leere Kontrollkavität muss einen Absorptionswert von unter 0,150 haben. Höhere Absorptionswerte als 0,150 sind als Hinweis auf unzureichendes Waschen oder Kontamination der Reagenzien zu interpretieren.
- Proben mit höheren spezifischen Antikörperwerten als die Obergrenze des Kalibrators sind positiv zu befunden mit einem Wert von "größer oder gleich als" der Wert welcher auf dem Etikett des Kalibratorserums angegeben ist.
- Der Konvertierungsfaktor muss für jeden Durchlauf separat berechnet werden. Wenn ein Konvertierungsfaktor aus einem anderen Durchlauf verwendet wird, werden die Ergebnisse unbrauchbar.
- Jedes Labor muss seine eigenen (normalen) Referenzwerte auf der Basis der Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren festlegen.
- Das Positivkontrollserum ist ein Humanserum, das antinukleäre Antikörper enthält. Dies ist eine qualitative Kontrolle, die einen Wert größer als 15 ANA-Einheiten ergeben sollte.
- Das Negativkontrollserum ist ein Pool von Humanserum, das keine antinukleären Antikörper enthält. Diese Kontrolle sollte Werte von weniger als 10 ANA-Einheiten ergeben.
- Das unverdünnte Positivkontrollserum ist ein Humanserum, das antinukleäre Antikörper enthält. Diese Kontrolle sollte einen Wert von mehr als 15 ANA Einheiten.

## INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

Dies ist ein qualitatives Assay. Die Anzahl der nachgewiesenen Antikörper besitzt keinerlei bekannte klinische Relevanz und die mit diesem Assay erzielten Einheitsgrößen dienen lediglich der Aufteilung der Patienten in die folgenden drei Hauptgruppen. Kavitäten mit Patientenproben, deren errechnete Werte größer als oder gleich 15 ANA-Einheiten sind, sind als positiv zu werten und sollten mit einem HEP-2 oder HEP-2000® Objektträger getestet werden, um ANA-Verfärbungsmuster zu bestimmen, und durch entsprechende Folgetests verifiziert werden. Die Patientenprobekavitäten, deren errechnete Werte niedriger als 10 ANA-Einheiten sind, sind als negativ zu werten. Werte zwischen 10 und 15 ANA-Einheiten sind als positive Grenzwerte zu sehen und sollten noch einmal mit einem HEP-2 oder HEP-2000® Objektträger getestet werden, um ANA-Verfärbungsmuster zu bestimmen, und durch entsprechende Folgetests verifiziert werden. Jedes Labor muss seinen eigenen Referenzbereich und eigene Cutoff-Werte auf Basis der getesteten Patientenpopulation ermitteln. Die Einheitswerte sind abhängig von Patientenfaktoren, mechanischen Gegebenheiten (wie Präzision der Pipetten), und Assay-Umständen (wie Temperatur und zeitliche Abfolge der Schritte.)

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Testergebnis ist als positiv oder negativ für antinukleäre Antikörper anzugeben. Die Zahl der Antikörper hat keine bekannte klinische Bedeutung.

## EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises antinukleärer Antikörper eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für antinukleäre Antikörper mit diesem Test sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Medikamente, darunter Procainamid und Hydralazin, können eine Lupus erythematosus-ähnliche Erkrankung induzieren (22). Patienten mit medikamentös induzierter LE können positive ANA aufweisen.
4. Auch wenn ein hoch-titriertes ANA als starkes Indiz für Bindegewebskrankheit zu sehen ist, ist der diagnostische Wert gering. Das Ergebnis sollte vielmehr in Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtprofil des Patienten bewertet werden.
5. Bei einem geringen Prozentsatz von Patienten mit infektiösen und/oder neoplastischen Krankheiten sind auch positive ANA sichtbar (9).

## ZU ERWARTENDE WERTE

Die Häufigkeit von Autoantikörpern gegenüber verschiedenen nukleären Antigenen variiert je nach Patientenpopulation sowie nach der Häufigkeit klinischer Rheumaerkrankungen in dieser Population. Mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz mit HEp-2 Zellen wurden antinukleäre Antikörper bei 95% der Patienten mit systemischem Lupus erythematosus, bei 90% der Patienten mit medikamentös induziertem Lupus, bei 95% der Patienten mit gemischter Bindegewebskrankheit, bei 80% der Patienten mit Sjögren-Syndrom und bei 90% der Patienten mit Sklerodermie nachgewiesen (23).

## LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Das Immuno Concepts RELISA<sup>®</sup> ANA Screening-Testsystem wurde mit einem anderen, im Handel erhältlichen ELISA antinukleären Antikörper-Testkit verglichen. Die studierte Population bestand aus 579 Proben, die in einem großen universitären medizinischen Zentrum auf antinukleäre Antikörper getestet wurden. Davon waren 90 Proben positive ANA-Proben, 242 Proben stammten von weiblichen Blutspendern und 261 Proben stammten von männlichen Blutspendern. Alle Proben wurden parallel im Prädikat- und Subjekt-Gerät getestet. Auf Basis dieses Vergleichs wurden die folgenden Daten aufgestellt:

		Prädikat	
		Positiv	Negativ
IC RELISA <sup>®</sup> antinukleärer Antikörpertest	Positiv	214	46
	Grenzwert	12	105
	Negativ	8	787

Ergebnisse im Grenzbereich wurden als positiv gewertet. Die Daten weisen eine Gesamtübereinstimmung von 85,4% auf.

Die große Zahl von "falsch-positiven" Proben im Test von Immuno Concepts war problematisch. Deshalb wurden alle diese Seren mit Hilfe des HEp-2000<sup>®</sup> ANA-Ro Testsystems auf antinukleäre Antikörper getestet. Bei 79 dieser "falsch-positiven" Proben traten deutlich sichtbare ANA-Muster auf, nachdem sie mit dem Verfahren der indirekten Fluoreszenz-Antikörper getestet wurden. Diese wurden als "echt positiv" für den Nachweis von antinukleären Antikörpern gewertet. Vier dieser "falsch-negativen" Proben wurden mit dem Verfahren der indirekten Fluoreszenz-Antikörper getestet und als "echt negativ" für den Nachweis von antinukleären Antikörpern gewertet. Nach Einbeziehung dieser Methode sah der Vergleich wie folgt aus:

		Referenzmethode	
		Positiv	Negativ
IC RELISA <sup>®</sup> antinukleärer Antikörpertest	Positiv	305	72
	Negativ	4	791

Die Daten weisen eine Gesamtübereinstimmung von 93,5% auf.

## REPRODUZIERBARKEIT

Neun positive Proben, zwei Proben im Grenzbereich und fünf negative Proben wurden auf drei verschiedenen Chargennummern Antigen-beschichteter Mikrotiterstreifen von verschiedenen Wissenschaftlern mehrfach getestet. In keinem Fall wies eine negative Probe positive Ergebnisse auf, die positiven Proben lieferten durchwegs deutlich positive Ergebnisse. Die Proben im Grenzbereich variierten zwischen negativen Werten und Grenzwerten.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleo-protein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease—An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Emlen, W., O'Neill, L. Clinical Significance of Antinuclear Antibodies (ANA): Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assays. Arthritis Rheum. 40:1612-1618, 1997.
22. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
23. von Mühlen, C.A., Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Semin. Arthritis Rheum. 24:323-358, 199

**Im Falle der Beschädigung der Schutzverpackung treten Sie vor Gebrauch bitte mit Immuno Concepts in Verbindung.**



Hersteller



Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft



Temperatur-Beschränkung



Enthält genügendes für <n> Tests



Beachten Sie die Anwendungsvorschriften



In vitro Medizinische Diagnoseeinheit



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 7096-11-I,

4.11.02.003.102-De

Rev 7.1

© Copyright 2016

# RELISA® ANA TESTVERFAHREN

**Vor der Testdurchführung müssen alle Proben, Reagenzien (auch der Waschpuffer) und Mikrotiterstreifen auf Zimmertemperatur gebracht werden.**

## 1. ARBEITSBLATT AUSFÜLLEN

In das mit dem Kit gelieferte Arbeitsblatt die Lage der Proben in den Mikrotiterplatten eintragen. Der Kalibrator sollte doppelt getestet werden. Eine Kavität dient als Leerwert. Es wird empfohlen, jede Patientenprobe und jedes Kontrollserum doppelt zu testen, bis eine für das Labor akzeptable Bestimmungsgenauigkeit erzielt wird.

## 2. WASCHPUFFERLÖSUNG VORBEREITEN (PBS-Tween)

Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Den Inhalt einer ganzen Flasche Waschpufferkonzentrat in den aufgelösten PBS-Puffer (1 Liter) hinzugeben und gut durchmischen. Die Waschpufferlösung kann verschluckt und gekühlt bei 2-25°C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.

## 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN

Patientenproben durch Zugabe von 25 µl Serum zu 975 µl Probenverdünner 1:40 verdünnen. Wenn die optionale unverdünnte ANA-getestete Positivkontrolle verwendet wird, genauso wie die Patientenproben verdünnen und gut durchmischen. Kalibrator, Positivkontrolle und Negativkontrolle sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

## 4. MIKROTITERSTREIFEN VORBEREITEN

Die benötigte Anzahl Streifen aus den Beuteln entnehmen und in den Halter einsetzen. Die Streifen müssen fest im Rahmen sitzen. Drücken Sie an beiden Enden des Streifens bis dieser sicher im Rahmen einrastet. Falls nur einzelne Kavitäten oder kein voller Streifen verwendet wird ist zu überprüfen ob jede Kavität fest sitzt. Streifen die korrekt im Halter sitzen können beim Umdrehen des Halters dann nicht herausfallen. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden können diese durch abknicken getrennt werden. Unbenutzte Streifen oder Kavitäten können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebstreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

## 5. SERUMVERDÜNNUNGEN AUFTRAGEN

Je 100 µl Kalibrator, Kontrollserum und verdünnte Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, wie im Arbeitsblatt eingetragen. 100 µl Probenverdünner in die für den Leerwert vorgesehene Kavität pipettieren.

## 6. STREIFEN INKUBIEREN (30 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-25°C)

Streifen bei Zimmertemperatur 30 Minuten lang inkubieren. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Gegebenenfalls die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abdecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.

## 7. STREIFEN WASCHEN (siehe allgemeine Verfahrenshinweise 5 und 6)

Kavitäten drei bis fünf Mal mit PBS-Tween-Waschpufferlösung auswaschen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavitäten aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Die Platten umdrehen und in der Luft kräftig ausschlagen, um alle Waschlösung aus den Kavitäten zu entfernen. Der Waschvorgang mit Füllen und Entfernen muss drei bis fünf Mal wiederholt werden. Danach die Platten auf einem Papierhandtuch oder vergleichbarem

Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird.

## 8. ENZYM-ANTIKÖRPER-REAGENS DISPENSIEREN

100 µl Enzym-Antikörper-Reagens in jede Kavität pipettieren.

## 9. STREIFEN INKUBIEREN (30 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-25°C)

Streifen bei Zimmertemperatur 30 Minuten lang inkubieren. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Gegebenenfalls die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abdecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.

## 10. STREIFEN WASCHEN

Kavitäten drei bis fünf Mal mit PBS-Tween-Waschpufferlösung auswaschen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavitäten aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Die Platten umdrehen und in der Luft kräftig ausschlagen, um alle Waschlösung aus den Kavitäten zu entfernen. Der Waschvorgang mit Füllen und Entfernen muss drei bis fünf Mal wiederholt werden. Danach die Platten auf einem Papierhandtuch oder vergleichbarem Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird.

## 11. SUBSTRATLÖSUNG DISPENSIEREN

Eine Laborstoppuhr verwenden, um sicherzustellen, dass die Zeiten genau eingehalten werden. 100 µl Substratlösung in jede Kavität pipettieren. Die Substratlösung muss in gleichmäßigen Zeitabständen zugegeben werden, damit sichergestellt ist, dass jede Kavität exakt 30 Minuten inkubiert wird. In Kavitäten, die positive Proben enthalten, verfärbt sich die Substratlösung blau. In den anderen Kavitäten bleibt die Lösung farblos oder wird nur schwach blau.

## 12. STREIFEN INKUBIEREN (genau 30 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-25°C)

Streifen bei Zimmertemperatur genau 30 Minuten lang inkubieren. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein.

## 13. STOPPREAGENS HINZUGEBEN

Nachdem die erste Kavität genau 30 Minuten inkubiert wurde, mit dieser anfangen und im selben Rhythmus wie bei der Substratlösung in jede Kavität 100 µl Stopplösung zugeben. Bei Zugabe der Stopplösung verfärbt sich blaue Substratlösung gelb, während farblose Lösung farblos bleibt.

## 14. ABSORPTIONSRATE IN DEN KAVITÄTEN MESSEN

Die Absorption der Kavitäten muss innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stoppreagens mit einem Spektrophotometer gemessen werden. Die Kavitäten werden bei 450 nm um den Leerwert bereinigt gemessen. Wenn die Möglichkeit besteht, bei einer zweiten Wellenlänge zu messen, auch bei 600-650 nm als Referenzwellenlänge messen. Werden die Werte in den Kavitäten ohne Referenzfilter berechnet, so führt dies zu höheren Absorptionswerten.

**TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG:** +1-916-363-2649  
oder via E-Mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)