



RELISA® PR3-ANCA TESTSYSTEM FÜR ANTIKÖRPER GEGEN PROTEINASE 3

**Zur In-vitro-Diagnostik
Nur für Fachpersonal bestimmt
Katalognummer: 7096-16**

VERWENDUNGSZWECK: Dies ist ein Enzymimmunoassay-Testsystem für den Nachweis von Antikörpern gegen Proteinase 3 (PR3) in Humanserum. Dieses Testsystem unterstützt den Antikörpernachweis bei Granulomatose mit Polyangiitis und anderen Vaskulitiden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Als antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper (ANCA) wird eine Gruppe von Antikörpern bezeichnet, die mit zytoplasmatischen Antigenen in menschlichen Neutrophilen reagieren. Diese Antikörper wurden zwar bereits 1964 erstmals nachgewiesen (1), aber erst im Jahr 1982 mit Krankheiten in Verbindung gebracht, als Davies et. al (2) die Antikörper bei acht Patienten mit segmental nekrotisierender Glomerulonephritis nachweisen konnten. 1984 wurden vier weitere Patienten mit Vaskulitis und Glomerulonephritis gemeldet. 1985 zeigten van der Woude et al einen engen Zusammenhang zwischen ANCA und Granulomatose mit Polyangiitis und die Korrelation der Antikörpertiter mit der Krankheitsaktivität auf.(3) 1988 entdeckten Falk und Jennette, dass ANCA mehr als eine Antigenspezifität aufweisen.(4) Später konnte die Korrelation zwischen der Spezifität von ANCA und den pathologischen Merkmalen von Vaskulitiden nachgewiesen werden.(5)

Bei Screening-Tests auf ANCA wird in der Regel ein indirekter Immunfluoreszenztest eingesetzt. Bei diesem Test können verschiedene Muster der Zellanfärbung auftreten. Zwei Hauptfärbungsmuster bei Durchführung des ANCA-Immunfluoreszenz-Tests an ethanolfixierten Neutrophilen wurden beschrieben und gut charakterisiert. Autoantikörper mit einem feinen granulären zytoplasmatischen Muster, so genannte c-ANCA, sind normalerweise gegen die Serinprotease Proteinase 3 (PR-3) gerichtet. Die starke Assoziation dieser Antikörper mit der Granulomatose mit Polyangiitis ist nachgewiesen. Das andere Hauptfärbemuster, das perinukleäre oder p-ANCA-Muster, das in der Regel durch gegen Myeloperoxidase (MPO) gerichtete Antikörper entsteht, wurde mit systemischer Vaskulitis und idiopathischer, nekrotisierender und sichelförmiger Glomerulonephritis assoziiert.(4) Alle Proben mit einem positiven Ergebnis bei indirekten Immunfluoreszenztests müssen mit einem Enzymimmunoassay (EIA) als MPO-ANCA oder PR3-ANCA bestätigt werden. Manche Autoren sind der Meinung, dass alle Proben von klinisch verdächtigen Patienten mit EIA getestet werden sollten, da 5 % aller Proben nur mit EIA positiv sind.(6) PR3-ANCA sind zwar am häufigsten bei Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis nachweisbar (bis zu 85 % der Patienten), allerdings sind sie nicht krankheitsspezifisch, da sie auch bei einem kleineren Prozentsatz der Patienten mit idiopathischer, nekrotisierender und sichelförmiger Glomerulonephritis vorhanden sind. Ähnlich sind MPO-ANCA bei bis zu 65 % der Patienten mit idiopathischer, nekrotisierender und sichelförmiger Glomerulonephritis assoziiert, können aber auch bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis auftreten. Bei der mikroskopischen Polyangiitis sind entweder MPO-ANCA oder PR3-ANCA bei jeweils etwa 45 % der Patienten nachweisbar.(7, 8, 9)

TESTPRINZIP

Dieser Test ist ein indirekter EIA. Bei diesem System wurden die Oberflächen der Vertiefungen von Mikrotiterstreifen mit stabilisierten humanen PR3-Antigenen beschichtet, die als Antigensubstrat dienen. Verdünnte Patientenproben werden in die Vertiefungen eingebracht und inkubiert, damit die spezifischen Antikörper in der Probe mit dem Antigen in der Festphase reagieren können. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Antikörper und anderer Serumproteine werden die Vertiefungen mit Anti-Human-Antikörpern von der Ziege inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind. Das an Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörperpräparat in diesem Testsystem ist spezifisch auf humane IgG-Gammaketten.

Bei positiven Ergebnissen entsteht nach der Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-Konjugat ein dreiteiliger Komplex. Dieser Komplex besteht aus an PR3 gebundenen, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-humanen Antikörpern, die ihrerseits an das stabilisierte Antigen auf der Kunststoff-Oberfläche gebunden sind.

Dieser Komplex kann nach einem weiteren Waschschrift durch Zugabe einer Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 enthaltenden Chromogensubstratlösung sichtbar gemacht werden. Der Grad der Farbentwicklung in der jeweiligen Vertiefung ist der PR3-Antikörperkonzentration in der betreffenden Serumprobe proportional. Alle Vertiefungen werden mit einem Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen.

SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Aufbewahrung: Alle Komponenten müssen gekühlt bei 2–10°C aufbewahrt werden. Nicht einfrieren.

Haltbarkeit: Die Komponenten sind mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Komponenten nicht mehr verwenden, wenn das Verfalldatum überschritten ist.

REAKTIVE REAGENZIEN

RELISA® PR3-beschichtete Mikrotiterstreifen **PLATE:** Katalognr. 7008-16. Mikrotiterplatte, enthält 12 mit humaner PR3 beschichtete Mikrotiterstreifen mit je acht Vertiefungen. Der Farbcode dieser Streifen ist grün. Werden für die Tests weniger als acht Vertiefungen benötigt, können die Vertiefungen abgetrennt werden. Ungebrauchte Streifen können im wieder verschlossenen Folienbeutel mit dem Trockenmittel bis zu 45 Tage lang gekühlt aufbewahrt werden.

RELISA® Probenverdünnungslösung **SOLN|DIL:** Katalognummer 7100 (100 ml). Patentgeschützte gepufferte Probenverdünnungslösung zur Verdünnung von Patientenproben.

RELISA® Enzym-Antikörperreagens – spezifisch auf humane IgG-Gammaketten **CONJ|HRP:** Katalognummer 7009-16 (14 ml). Anti-human-IgG (Gammakettenspezifisch), an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagenz.

RELISA® Substratlösung **SOLN|SUB:** Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-spezifische Enzymsubstratlösung, enthält stabilisiertes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Gebrauchsfertiges Reagenz.

RELISA® Stoppreagens **SOLN|STOP:** Katalognummer 7033 (14 ml). Spezielle Stopplösung für EIA-Testsysteme von Immuno Concepts. Gebrauchsfertiges Reagens. **ACHTUNG:** 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® PR3-Kalibratorseren **CAL:** Katalognummern 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (je 2 ml). Humanserum, die Antikörper gegen PR3 enthalten. Der Testwert für jedes Serum ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Die Sera sind gebrauchsfertig verdünnt.

RELISA® PR3-Positivkontrollserum **CONTROL|+:** Katalognummer 7021-16 (2 ml). Human-Positivkontrollserum mit Antikörpern gegen PR3. Dieses Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

RELISA® Negativkontrollserum **CONTROL|-:** Katalognummer 7031 (2 ml). Human-Negativkontrollserum, frei von Antikörpern gegen PR3. Dieses Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

RELISA® Optionales unverdünntes getestetes PR3-Positivkontrollserum **OPT+**: Katalognummer 7022-16 (0,25 ml). Human-Positivkontrollserum mit Antikörpern gegen PR3. Dieses Positivkontrollserum wie unverdünntes Serum behandeln. Der Testwert für dieses Serum ist auf dem Fläschchenetikett angegeben.

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

Mikrotiterstreifenhalter

Waschpufferlösung:

PBS-Puffer **PWDR|PBS**: Katalognr. 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für einen Liter Pufferlösung. (Für jede 96er-Mikrotiterplatte sind zwei Beutel Pufferpulver im Lieferumfang des Testkits enthalten.)

Waschpufferkonzentrat **SOLN|WASH**: Katalognr. 1031 (10 ml). 5%ige Tween 20 Lösung zur Verwendung im Waschpuffer. (Für jede 96er-Mikrotiterplatte sind zwei Fläschchen Pufferkonzentrat im Lieferumfang des Testkits enthalten.)

Herstellung: Einen Beutel Pufferpulver in einem Liter entionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Den gesamten Inhalt einer Flasche Waschpufferkonzentrat zur PBS-Pufferlösung hinzufügen. Gut durchmischen und bei 2-25°C bis zu vier Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind. Die Waschpufferlösung muss vor dem Gebrauch Raumtemperatur (18–25°C) angenommen haben.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Volumetrische Präzisionspipettiervorrichtung für Volumina von 25–1000 µl.
Spritzflasche für das Einbringen von Waschpufferlösung in die Vertiefungen bzw. automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten.
Ein-Liter-Behälter für PBS-Waschpufferlösung
Entionisiertes oder destilliertes Wasser
Plattenlesegerät (Spektralphotometer) für Extinktionsmessungen bei 450 nm.
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen
Saugpapier oder Papierhandtücher
Multikanal-Pipette für 8 Vertiefungen
Einmalhandschuhe
Labor-Stoppuhr

SICHERHEITSHINWEISE

1. Alle in diesem Produkt verwendeten Materialien humanen 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 Erreger vom Typ HIV-1, HIV-2, Hepatitis C, Hepatitis B bzw. andere Infektionserreger vorhanden sind. Daher müssen alle Materialien des Kits wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben müssen nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie im Handbuch der Centers for Disease Control/National Institutes of Health für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Ausgabe 1999, empfohlen*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder die Zugabe von nicht zum System gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren in Abflüssen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen stets mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Dieses Kit ist zur *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Niemals mundpipettieren und Haut- und Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Bei versehentlichem Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife abwaschen.
7. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht essen, trinken oder rauchen.
8. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
9. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten bzw. -temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
10. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann die Ergebnisse verfälschen. Die Proben dürfen sich während des Tests nur in den Vertiefungen der Mikrotiterstreifen befinden.

11. Wieder verwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um alle Rückstände von Reinigungsmitteln zu entfernen. Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
12. Alle Reagenzien, Mikrotiterstreifen und Proben vor Gebrauch Raumtemperatur (18–25 °C) annehmen lassen.
13. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien müssen Einmalhandschuhe getragen werden. Anschließend die Hände gründlich waschen.
14. Mikrobielle Verunreinigungen der Reagenzien oder Proben können 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

Probennahme: Die Tests sollten nach Möglichkeit an Serumproben durchgeführt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Raumtemperatur (18–25°C) gerinnen lassen. Zur Vermeidung von Hämolyse muss das Serum anschließend so bald wie möglich durch Zentrifugieren abgetrennt werden.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, die Ergebnisse in diesen Fällen verfälscht werden können. Proben, in denen Feststoffe sichtbar sind, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Serumproben können bei 2–10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Bei einer weiteren Verzögerung der Tests sollten die Proben bei höchstens –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 sind falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse möglich.

ALLGEMEINE HINWEISE ZUM VERFAHREN

1. Alle Kitkomponenten und Serumproben müssen vor dem Gebrauch unbedingt auf Raumtemperatur (18–25°C) gebracht werden. Bei einem ganzen Liter Waschpuffer kann es mehrere Stunden dauern, bis er nach der Entnahme aus dem Kühlschrank eine Temperatur von 20°C angenommen hat. Inkubationstemperaturen außerhalb des angegebenen Bereichs können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Nicht verwendete Proben und Reagenzien nach Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.
2. Reagenzien vor dem Gebrauch durch vorsichtiges Umdrehen gut mischen. Reagenzien nicht vortexen oder schütteln. Schaumbildung vermeiden.
3. Beim Ansetzen von Probenlösungen müssen die Pipettenspitzen vor dem Dispensieren des Serums in das Probenverdünnungsmittel abgewischt werden. An der Außenseite der Pipette anhaftendes überschüssiges Probenmaterial kann die Ergebnisse verfälschen.
4. Empfohlen wird eine Multikanal-Pipette, da diese die einheitliche Reagenziendispensierung und gleichbleibende Inkubations- und Reaktionszeiten ermöglicht.
5. **Besonders wichtig ist das ausreichende Waschen der Vertiefungen.** Nicht ausreichend gespülte Vertiefungen können hohe Hintergrundwerte erzeugen und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Für manuelle Waschvorgänge den Inhalt der Vertiefungen aspirieren und anschließend jede Vertiefung mit ausreichend Waschpufferlösung füllen. Kreuzkontamination der Vertiefungen vermeiden, insbesondere im ersten Waschschrift nach der Aspiration. Den Waschpuffer durch Umdrehen vollständig aus den Vertiefungen entfernen, dann verbleibende Waschpufferreste mit einer scharfen Bewegung aus dem Handgelenk herausklopfen. Die Waschschriffe insgesamt 3 bis 5-mal wiederholen. Anschließend sollten die Platten energisch auf einem Papiertuch oder sonstigem saugfähigem Material ausgeklopft werden, um alle Waschpufferreste zu entfernen. Empfohlen wird die Verwendung eines automatischen Waschsyste.ms für Mikrotiterplatten, weil dieses das einheitliche Waschen der Vertiefungen gewährleistet.
HINWEIS: Da viele unterschiedliche Waschverfahren und automatische Systeme angeboten werden, kann die Anzahl der Waschschriffe angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Jedes Labor sollte die optimale Anzahl von Waschschriffen für das verwendete Waschsyste.ms selbst ermitteln.
6. Werden nicht alle Waschpufferreste entfernt, kann es zur uneinheitlichen Farbentwicklung kommen. Um das Risiko von Waschpufferresten so gering wie möglich zu halten, müssen die Mikrotiterstreifen mit saugfähigem Papier oder Zellstoff abgetupft werden.

7. Besonders wichtig ist die Zeiteinteilung der Arbeitsschritte. Alle Serumproben müssen vor Beginn des Verfahrens verdünnt und danach so bald wie möglich in die Vertiefungen dispensiert werden (höchstens innerhalb von fünf Minuten). Die Losgrößen sind so wählen, dass die Probenverarbeitung innerhalb dieses Zeitraums bequem möglich ist. Multikanal-Pipetten erleichtern die Handhabung von Proben und Reagenzien und werden daher empfohlen.
8. Mit Ausnahme der letzten Inkubation (Substratlösung) beginnt jede Inkubationsfrist mit Abschluss der Dispensierung von Probe bzw. Reagens. Die Dauer der Inkubation mit Substratlösung muss für jede Vertiefung genau 15 Minuten betragen. Alle Proben und Reagenzien müssen in derselben Reihenfolge und mit gleichbleibender Geschwindigkeit dispensiert werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Berechnungen

1. Den Extinktionswert der Leerprobe von den in den Vertiefungen mit den Kalibratorseren, Kontrollreagenzien und Patientenproben ermittelten Extinktionswerten subtrahieren. Bei Doppelbestimmungen den mittleren Extinktionswert der betreffenden Vertiefungen berechnen.
2. Den mittleren Extinktionswert für jedes Kalibratorserum auf dem RELISA[®] PR3 Kalibrator-Arbeitsblatt einzeichnen. Die Kalibratorpunkte mit einer Ausgleichsgeraden verbinden. Im Falle der Verwendung eines programmierbaren Mikropplattenlesers kann die Standardkurve mit Hilfe eines lin-lin Plots mit einer best-fit Kurve berechnet werden.
3. Durch Interpolation von der Kalibratorlinie aus kann für jede Patientenprobe der Wert in Einheiten ermittelt werden.

OPTIONALE EIPUNKTKALIBRATIONSMETHODE

1. Den Extinktionswert der Leerprobe von den in den Vertiefungen mit den Kalibratorseren, Kontrollreagenzien und Patientenproben ermittelten Extinktionswerten subtrahieren. Bei Doppelbestimmungen den mittleren Extinktionswert der betreffenden Vertiefungen berechnen.
2. Um den Umrechnungsfaktor zu erhalten, die spezifische Antikörper-Konzentration des Kalibratorserums Nr. 3 (auf dem Etikett angegeben) durch den mittleren Extinktionswert der Kalibratorvertiefungen dividieren.
3. Den Extinktionswert jeder einzelnen Probe mit dem Umrechnungsfaktor multiplizieren, um die spezifische Antikörper-Konzentration in Einheiten zu erhalten.
4. Diese Berechnungen können vereinfacht ausgedrückt werden als:

$$\frac{\text{Wert Kalibratorlösung Nr. 3 (Einheiten)}}{\text{Extinktion von Kalibrator Nr. 3}} \times \text{Extinktionswert der Probe}^* = \text{Wert in Einheiten für die Probe}$$

*Bei einer Analyse der Kalibratorseren und Patientenproben in Doppelbestimmung den Mittelwert der doppelt bestimmten Vertiefungen verwenden.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Der mittlere Extinktionswert des Kalibratorserums Nr. 3 muss mindestens 0,400 betragen. Extinktionswerte unter 0,400 sind ein Anzeichen für unzureichende Farbentwicklung und machen den Lauf ungültig. Eine nicht ausreichende Farbentwicklung wird in der Regel durch zu kalte Reagenzien oder falsche Zeiten bei einem oder mehreren Arbeitsschritten des Assays verursacht. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18–25 °C) bringen und Verfahren wiederholen, dabei besonders genau auf die Zeiten bei allen Arbeitsschritten achten.
2. Der Extinktionswert der Vertiefung mit der Leerprobe muss unter 0,150 liegen. Extinktionswerte der Leerprobe über 0,150 sind ein Anzeichen für Fehler beim Waschen oder verunreinigte Reagenzien und machen den Lauf ungültig.
3. Proben mit spezifischen Antikörperwerten über dem oberen Grenzwert des Kalibratorserums Nr. 5 müssen als höher als der Wert in Einheiten von Kalibrator Nr. 5 angegeben werden.
4. Die Kalibratorlinie muss für jeden Lauf geplottet werden (bzw. muss bei der optionalen Einpunktkalibration der Umrechnungsfaktor berechnet werden). Eine Kalibratorlinie bzw. ein Umrechnungsfaktor aus einem anderen Lauf machen die Ergebnisse ungültig.
5. Jedes Labor muss auf Basis der jeweiligen Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren eigene Werte für Referenz- (Normal-)bereiche ermitteln und verwenden.
6. Bei dem Positivkontrollserum handelt es sich um ein Humanserum, das Antikörper gegen PR3 enthält. Dies ist eine qualitative Kontrolle, die einen Wert über 35 Einheiten ergeben muss.
7. Bei dem Negativkontrollserum handelt es sich um einen Humanserumpool ohne Antikörper gegen PR3. Der Wert dieser Kontrolle muss unter 35 Einheiten liegen.

- Bei dem unverdünnten getesteten Positivkontrollserum handelt es sich um ein Humanserum, das Antikörper gegen PR3 enthält. Der Testwert für dieses Kontrollreagenz ist auf dem Etikett in PR3-Einheiten angegeben. Dieser Bereich wurde festgelegt, um 99 % der aufgrund der normalen statistischen Abweichung erwarteten Werte einzuschließen. Gelegentliche kleinere Abweichungen außerhalb dieser Bereiche sind zu erwarten. Jedes Labor muss anhand der Erfahrungen mit diesem Assay eigene Akzeptanz- bzw. Ablehnungskriterien festlegen.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

Es ist zwar bekannt, dass die Spiegel der Antikörper gegen PR3 im Verlauf der Krankheit steigen und fallen, aber die klinische Bedeutung der einzelnen Antikörperkonzentrationen wird momentan noch erforscht.(9) Die mit diesem Assay ermittelten Werte in Einheiten sind ausschließlich dafür bestimmt, Patienten in folgende große Gruppen einzuteilen. Vertiefungen mit Patientenproben mit berechneten Werten von mindestens 35 Einheiten sind als positiv zu werten. Vertiefungen mit Patientenproben mit berechneten Werten von bis zu 35 Einheiten sind als negativ zu werten. Jedes Labor muss auf Basis der getesteten Population selbst eigene Referenzbereiche und Grenzwerte festlegen. Die Werte in Einheiten werden von Patientenfaktoren, mechanischen Aspekten (z.B. Präzision und Genauigkeit beim Pipettieren) und den Testbedingungen (wie Temperatur und Zeiteinteilung der Arbeitsschritte) beeinflusst. Serielle Bestimmungen der Antikörperspiegel können bei einem bestimmten Patienten den Anstieg bzw. das Absinken der Antikörperkonzentrationen aufzeigen.

ANGABE DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind mit dem Wert in Einheiten als positiv oder negativ auf Antikörper gegen PR3 anzugeben. Die in einer einzigen Probe gemessenen Antikörperspiegel haben eine nur beschränkte klinische Bedeutung. Serielle Bestimmungen der Antikörperspiegel bei einem bestimmten Patienten können den Anstieg bzw. das Absinken der Antikörperkonzentrationen aufzeigen, von denen bekannt ist, dass sie dem Verlauf der Krankheit folgen.

BESCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Der Nachweis von PR3-ANCA-Antikörpern allein ist für eine Diagnose nicht ausreichend. Diese Ergebnisse müssen immer im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den Symptomen des Patienten, dem körperlichen Befund und anderen diagnostischen Methoden interpretiert werden.
- Lediglich auf Basis eines positiven Tests auf Antikörper gegen PR3 darf keine Behandlung initiiert werden. Für den Beginn einer Therapie müssen klinische Symptome, weitere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Arztes herangezogen werden.
- Das Ergebnis dieses Tests muss im Zusammenhang mit den Informationen aus der klinischen Untersuchung und anderen diagnostischen Verfahren zur Bestimmung des klinischen Status des Patienten verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

In einer normalen Population liegt der zu erwartende Wert unter 35 Einheiten (negativ). PR3-ANCA wurden bei bis zu 85 % der Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, bei 45 % der Patienten mit mikroskopischer Polyangiitis und bei einem kleineren Prozentsatz der Patienten mit idiopathischer, nekrotisierender und sichelförmiger Glomerulonephritis nachgewiesen.(9)

REFERENZBEREICH

Der Referenzbereich wurde durch Tests an Serumproben von 500 gesunden Blutspendern, darunter 239 Frauen und 261 Männer, ermittelt, von denen keine rheumatischen Erkrankungen bekannt waren. Auf Grundlage einer anhand dieser Daten erstellten ROC-Kurve wurde der normale Grenzwert mit weniger als 35 Einheiten PR3 festgelegt.

Aufgrund der inhärenten Abweichungen bei ELISA-Assays sollten Werte im Bereich von fünf Einheiten über bzw. unter dem positiven oder negativen Grenzwert (d.h. zwischen 30 und 40 Einheiten) besonders sorgfältig ausgewertet werden. Für die Auswertung der Ergebnisse dieses Assays müssen der klinische Befund, Anzeichen, Symptome, der Eindruck des Arztes und weitere Laborbefunde herangezogen werden.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Das RELISA® PR3-Testsystem von Immuno Concepts wurde mit einem anderen, im Handel erhältlichen ELISA MPO-Testsystem verglichen. Die untersuchte Population umfasste 173 Proben, die für Tests auf ANCA, MPO und PR3, aber ohne spezifische Diagnosen, an klinische Labors eingeschickt worden waren, 10 Proben von Patienten mit einer Diagnose von mikroskopischer Polyangiitis, 15 Proben von Patienten mit einer Diagnose von nekrotisierender sichelförmiger Glomerulonephritis, 12 Proben von Patienten mit einer Diagnose von Polyarteritis nodosa, 7 Proben von Patienten mit einer Diagnose von eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis, 12 Proben von Patienten mit einer Diagnose von Vaskulitis, 25 Proben von Patienten mit einer Diagnose von Granulomatose mit Polyangiitis sowie 261 Proben von männlichen und 239 Proben von weiblichen Blutspendern. Alle Proben wurden parallel im Prädikat- und Subjekt-Gerät getestet. Auf Basis dieses Vergleichs wurden die folgenden Daten mithilfe einer Fünfpunktkalibrationskurve aufgestellt:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Antikörpertest	Prädikat Anti-PR3-Test	
	Positiv	Negativ
Positiv	179	8
Negativ	4	563

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Werte: relative Sensitivität 97,8%; relative Spezifität 98,6%; Gesamtübereinstimmung 98,4%.

Unter den 8 „falsch-positiven“ Proben zeigten 2 bei Immunfluoreszenz ein p-ANCA-Muster, 4 ein c-ANCA-Muster und 2 keinerlei Immunfluoreszenz-Muster. Zwei der Proben mit c-ANCA-Muster bei Immunfluoreszenz und einem positiven Ergebnis mit RELISA® PR3 stammten von Patienten mit einer Diagnose von Granulomatose mit Polyangiitis, während eine der Proben mit einem positiven p-ANCA-Muster bei Immunfluoreszenz und einem positiven Ergebnis mit RELISA® PR3 von einem Patienten mit eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis stammte. Bei diesen Proben kann es sich um „falsch-negative“ Ergebnisse mit dem Prädikat-Gerät handeln.

Folgende Daten wurden mithilfe der optionalen Einpunktkalibrationsmethode erzielt:

Immuno Concepts RELISA® PR3 Antikörpertest	Prädikat Anti-PR3-Test	
	Positiv	Negativ
Positiv	176	4
Negativ	7	567

Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Werte: relative Sensitivität 96,2%; relative Spezifität 99,3%; Gesamtübereinstimmung 98,5%.

Reproduzierbarkeit

Die Präzision des Tests wurde anhand von sieben Proben, deren PR3-ANCA-Werte im Bereich der Kalibrationskurve lagen, bestimmt. Diese Proben wurden in Doppelbestimmung mit drei verschiedenen Chargen von antigenbeschichteten Mikrotiterstreifen bei drei verschiedenen Durchläufen von drei unterschiedlichen Laborfachkräften getestet. Die Präzision innerhalb des Tests und zwischen Tests ist in den folgenden Tabellen dargestellt:

Präzision Innerhalb des Tests

n=21	Konzentration (Einheiten)	SA	% VK
Probe 1	125	7	5
Probe 2	97	8	8
Probe 3	74	3	4
Probe 4	65	4	6
Probe 5	59	4	7
Probe 6	117	6	5
Probe 7	240	11	5

Präzision zwischen Tests

n=3	Konzentration (Einheiten)	SA	% VK
Probe 1	125	9	7
Probe 2	97	7	8
Probe 3	74	6	9
Probe 4	65	10	15
Probe 5	59	8	14
Probe 6	117	16	14
Probe 7	240	12	5

LINEARITÄT

Der Test ist innerhalb des Bereichs der Kalibrationskurve linear, wie durch die Verfahren in der NCCLS-Richtlinie *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods* aufgezeigt.(10)

VALIDIERUNG DER EINPUNKTKALIBRATION

Der Einsatz eines Einpunktkalibrators wurde mit derselben Gruppe von 754 Serumproben validiert, die für den Vergleich mit dem Prädikat-Gerät verwendet worden waren. Die Regressionsanalyse dieses Vergleichs ergab einen Regressionskoeffizienten (r^2) von 99,2%; die Varianzanalyse (ANOVA) der Daten zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Methoden. Aus dem Praxisaspekt betrachtet, ergab dieser Vergleich nur drei Proben (0,4%) mit diagnostischen Diskrepanzen zwischen dem Fünfpunktkalibrationssystem und dem optionalen Einpunktkalibrationssystem. Bei all diesen Proben lagen die PR3-Werte in der Nähe des Grenzwerts von 35 Einheiten, und zwar zwischen 31 und 40 Einheiten. (10) Proben dieses Typs sind in jedem Assaysystem problematisch für die Diagnostik und müssen von den Labormitarbeitern, welche die Proben analysieren und die Daten interpretieren, besonders sorgfältig ausgewertet werden.

KREUZREAKTIVITÄTSSTUDIEN

Insgesamt 40 Serumproben mit anderen Autoantikörpern als Anti-PR3-ANCA wurden mit dem RELISA® PR3-Testsystem von Immuno Concepts getestet. Bei diesen Proben handelte es sich um gängige antinukleäre Antikörpermuster (z.B. homogen, gesprenkelt oder nukleolär) sowie um Antikörper gegen zytoplasmatische Komponenten wie Mitochondrien, den Golgi-Apparat und das Zytoskelett. Zwanzig der Proben enthielten Rheumafaktoren. Keine dieser Proben ergab mit dem RELISA® PR3-Testsystem von Immuno Concepts ein positives Ergebnis.

BIBLIOGRAPHIE

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotizing Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318:1651-1657, 1988.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-associated Glomerulonephritis and Vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. Savige, J., Gillis, D., Benson, E., et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 111:507-513, 1999.
7. Kallenberg, C.G.M. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase. In: Peter, J.B. and Shoenfeld, Y., eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. 1996: 53-60.
8. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
9. Falk, R.J., Jennette, J.C. ANCA Small-Vessel Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:314-322, 1997.
10. Vorhandene Daten, Immuno Concepts, N.A. Ltd.

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
E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

RELISA® ANCA-PR3 TESTVERFAHREN

Alle Proben (einschließlich der Waschpufferlösung) müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur angenommen haben.

- 1. ARBEITSBLATT VORBEREITEN**

Das mit dem Kit mitgelieferte Arbeitsblatt beschriften, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen anzuzeigen. Die Kalibratorseren in Doppelbestimmung testen. Um die Multi-Punkt-Kurve verwenden zu können, müssen alle 5 Kalibratorseren getestet werden. Für die optionale Einpunktkalibration braucht nur Kalibratorserum Nr. 3 in Doppelbestimmung getestet zu werden. Eine Vertiefung wird für eine Leerprobe benötigt. Wir empfehlen, auch alle Kontrollreagenzien und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen, bis Ihr Labor die akzeptable Präzision für den Assay ermittelt hat.
- 2. WASCHPUFFERLÖSUNG ANSETZEN (PBS-Tween)**

Den Inhalt eines Beutels PBS-Pufferpulver in einem Liter entionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Den gesamten Inhalt einer Flasche Waschpufferkonzentrat zu dem Einliter-Behälter mit der PBS-Pufferlösung hinzugeben. Gut mischen. Die Pufferlösung kann verschlossen bei 2–25 °C gekühlt bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.
- 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN**

Die Patientenproben durch Zugabe von 25 µl Serum zu 975 µl Probenverdünnungsmittel im Verhältnis 1:40 verdünnen. Das optionale unverdünnte getestete PR3-Positivkontrollserum ggf. im gleichen Verhältnis wie die Patientenproben verdünnen. Gut mischen. Kalibratoren, Positivkontrollserum und Negativkontrollserum werden gebrauchsfertig verdünnt geliefert und müssen nicht mehr 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 Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- 5. SERUMVERDÜNNUNGEN DISPENSIEREN**

Je 100 µl Kalibrator, Kontrollseren und verdünnte Patientenproben wie im Arbeitsblatt eingezeichnet in die entsprechenden Vertiefungen dispensieren. 100 µl Probenverdünnungsmittel in die Vertiefung für die Leerprobe dispensieren.
- 6. STREIFEN INKUBIEREN (30 Minuten bei Raumtemperatur, d.h. 18–25 °C).**

Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Streifen müssen während der Inkubation vor Zugluft und Temperaturschwankungen geschützt sein. Auf Wunsch können die Streifen mit transparentem Klebstreifen oder einem Papiertuch abgedeckt werden, um sie gegen Staub oder Fremdkörper zu schützen.
- 7. STREIFEN WASCHEN (Siehe Allgemeine Hinweise zum Verfahren Nr. 5 und 6)**

Vertiefungen 3-bis 5mal mit der PBS-Tween-Waschpufferlösung ausspülen. Für manuelle Waschvorgänge den Inhalt der Vertiefungen aspirieren und anschließend jede Vertiefung mit ausreichend Waschpufferlösung füllen. Kreuzkontamination der Vertiefungen vermeiden, insbesondere im ersten Waschschrift nach der Aspiration. Den Waschpuffer durch Umdrehen vollständig aus den Vertiefungen entfernen, dann verbleibende Waschpufferreste mit einer scharfen Bewegung aus dem Handgelenk herausklopfen. Die Waschschrift insgesamt 3 bis 5-mal wiederholen. Anschließend sollten die Platten energisch auf einem Papiertuch oder sonstigem saugfähigem Material ausgeklopft werden, um alle Waschpufferreste zu entfernen.
- 8. ENZYM-ANTIKÖRPERREAGENS DISPENSIEREN**

In jede Vertiefung 100 µl Enzym-Antikörperreagens dispensieren.
- 9. STREIFEN INKUBIEREN (30 Minuten bei Raumtemperatur, d.h. 18–25 °C).**

Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Streifen müssen während der Inkubation vor Zugluft und Temperaturschwankungen geschützt sein. Auf Wunsch können die Streifen mit transparentem Klebstreifen oder einem Papiertuch abgedeckt werden, um sie gegen Staub oder Fremdkörper zu schützen.
- 10. STREIFEN WASCHEN**

Vertiefungen 3-bis 5mal mit der PBS-Tween-Waschpufferlösung ausspülen. Für manuelle Waschvorgänge den Inhalt der Vertiefungen aspirieren und anschließend jede Vertiefung mit ausreichend Waschpufferlösung füllen. Kreuzkontamination der Vertiefungen vermeiden, insbesondere im ersten Waschschrift nach der Aspiration. Den Waschpuffer durch Umdrehen vollständig aus den Vertiefungen entfernen, dann verbleibende Waschpufferreste mit einer scharfen Bewegung aus dem Handgelenk herausklopfen. Die Waschschrift insgesamt 3 bis 5-mal wiederholen. Anschließend sollten die Platten energisch auf einem Papiertuch oder sonstigem saugfähigem Material ausgeklopft werden, um alle Waschpufferreste zu entfernen.
- 11. SUBSTRATLÖSUNG DISPENSIEREN**

100 µl Substratlösung in jede Vertiefung dispensieren, dabei einen Zeitmesser verwenden, um einheitlich Intervalle zu gewährleisten. Die Substratlösung muss den Vertiefungen in einer gleichbleibenden Geschwindigkeit zugegeben werden, damit jede Vertiefung exakt gleich lang inkubiert wird (15 Minuten). Die Substratlösung in den mit positiven Proben inkubierten Vertiefungen färbt sich blau, während die Lösung in den Vertiefungen mit negativen Proben farblos bis blassblau ist.
- 12. STREIFEN INKUBIEREN (Genau 15 Minuten bei Raumtemperatur, d.h. 18–25 °C).**

Bei Raumtemperatur genau 15 Minuten inkubieren. Die Streifen müssen während der Inkubation vor Zugluft und Temperaturschwankungen geschützt sein.
- 13. STOPPREAGENS DISPENSIEREN**

Nach einer Inkubationsdauer von genau 15 Minuten 100 µl Stoppreagens in jede Vertiefung geben, dabei dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit einhalten, mit der die Substratlösung zugegeben wurde. Nach Zugabe des Stoppreagens färbt sich die blaue Substratlösung gelb, während die farblose Lösung farblos bleibt.
- 14. EXTINKTION DER VERTIEFUNGEN ABLESEN**

Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stoppreagens müssen die Vertiefungen mit einem Plattenlesegerät (Spektralphotometer) abgelesen werden. Die Vertiefungen werden bei 450 nm gegen die Vertiefung mit der Leerprobe abgelesen. Ist ein Spektralphotometer mit zweifacher Wellenlänge verfügbar, sollte die Wellenlänge für den Referenzfilter bei 600–650 nm eingestellt werden. Die Ablesung der Vertiefungen bei 450 nm ohne Referenzfilter ergibt höhere Extinktionswerte.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG: +1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com