

RELISA® ENA EINZEL-SCREENING FÜR ANTIKÖRPER GEGEN EXTRAHIERBARE NUKLEÄRE ANTIGENE

Nur zur In Vitro-Diagnostik

Für Professionellen Gebrauch

Katalognummer: 7096-10 (96 Kavitäten) und 7696-10 (576 Kavitäten)

VERWENDUNGSZWECK: Dies ist ein Enzymimmuntest (EIA) für den Nachweis von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und Jo-1 in Humanserum. Der Test dient als Hilfestellung bei der Diagnose von Autoimmunerkrankungen.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

ENA-Antikörper (extrahierbare nukleäre Antigene) werden mit mehreren Autoimmunsyndromen in Verbindung gebracht und haben offenbar einen diagnostischen und/oder prognostischen Wert bei systemischer Sklerose (1, 2), gemischter Bindegewebskrankheit (3-5), Sjögren-Syndrom (6, 7), Polymyositis (8), Dermatomyositis (9), systemischem Lupus erythematosus (5) und rheumatoider Arthritis (10). Der antinukleäre Antikörpertest (ANA) wird als Screening-Test für diese Antikörper verwendet, gibt jedoch keinen Hinweis auf die Spezifität der Antikörper, und Antikörper gegen einige ENA weisen keine positiven ANA-Testwerte auf (11, 12). Es wird deshalb dringend ein zweiter Bestätigungstest für Antikörper gegen ENA empfohlen (13).

Das Sm (Smith) Antigen wurde 1966 von Tan und Kunkel als kochsalzlösliches, nicht-histonisches Glykoprotein identifiziert, das für seine Antigenizität nicht DNA- oder RNA-abhängig ist (14). Antikörper gegen Sm gelten wegen ihrer ausgeprägten Spezifität für systemischen Lupus erythematosus (SLE) als spezifischer serologischer Marker. Diese Antikörper treten bei bis zu 30% der SLE-Patienten auf und werden mit aktiver Nierenkrankheit und Zerebritis (15-17) in Verbindung gebracht.

Antikörper gegen Sm werden häufig zusammen mit U1-RNP-Antikörpern im Serum von SLE-Patienten nachgewiesen (18, 19). Anders als Antikörper gegen Sm sind Antikörper gegen RNP nicht als spezifische serologische Marker anzusehen, da sie bei Patienten mit den verschiedensten rheumatischen Erkrankungen, einschließlich SLE, Sklerodermie, Sjögren-Syndrom und rheumatoider Arthritis, auftreten. Hochtitrierte RNP-Antikörper allein werden jedoch überwiegend mit gemischter Bindegewebskrankheit (MCTD) in Verbindung gebracht. Bei Patienten mit MCTD tritt typischerweise eine Kombination der klinischen Merkmale auf, wie sie für SLE, Sklerodermie und Polymyositis charakteristisch sind. Diese Patienten zeigen häufig auch ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Kortikosteroiden und im Vergleich zu SLE-Patienten eine geringere Häufigkeit von Nierenerkrankungen (20, 21).

SSA und SSB wurden ursprünglich als nukleäre RNA-Proteinantigene bei Patienten mit Sjögren-Syndrom beschrieben (6,7). Ro und La wurden als zytoplasmische RNA-Proteinantigene bei Patienten mit SLE beschrieben (22, 23). Inzwischen wird allgemein akzeptiert, dass SSA und Ro analog sind, dass SSB und La analog sind, und dass diese Antigene sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vorkommen. Antikörper gegen SSA/Ro allein oder SSA/Ro und SSB/La treten bei bis zu 62% der Patienten mit subakutem kutanem Lupus auf (24) sowie bei 85% der Patienten mit Sjögren-Syndrom, die eine Vaskulitis entwickeln (25). Antikörper gegen SSA/Ro allein treten bei Patienten mit homozygotem Defekt der C2-Komplementärfraktion auf (26) sowie bei Patienten mit primärer biliärer Leberzirrhose, die Sjögren-Syndrom (27) entwickeln, und bei bis zu zwei Dritteln der Patienten mit „ANA-negativem SLE“ (28).

Das SSA/Ro Autoantigen ist ein Komplex aus dem Ro60 Protein und dem Ro52 Protein mit sogenannten "small ribonukleoproteins".

Dieser Komplex wird manchmal auch "SSA/Ro hY-RNA" Komplex genannt und er schließt das SSB/La Protein mit ein. Während Ro60 stark mit diesem Komplex assoziiert ist, hat Ro52 nur schwach assoziiert (29).

Das Scl-70 Antigen wurde als zelluläres Enzym, DNA Topoisomerase I, identifiziert (30). Über Antikörper gegen Scl-70 in bis zu 56% der Patienten mit progressiver systemischer Sklerose, insbesondere in der Untergruppe von Patienten mit diffuser Sklerodermie, wurde berichtet (31). Diese Autoantikörper gelten als Marker für PSS, da sie in anderen Bindegewebskrankheiten nicht festzustellen sind.

Antikörper gegen Jo-1, bei dem es sich um das Zellular-Enzym Histidyl tRNA Synthetase handelt, sind in 25-30% der Patienten mit Polymyositis oder Dermatomyositis zu finden, jedoch nicht in anderen Myopathien (11, 32). Es hat sich gezeigt, dass Anti Jo-1 Antikörper in engem Zusammenhang mit der interstitiellen Lungenkrankheit stehen, die zusammen mit Myositis (32) auftritt.

TESTPRINZIP

Dieser Test ist ein qualitativer, indirekter Enzym-Immuntest. Die Oberfläche der Mikrotiterplatten wurde mit stabilisierten Präparaten affinitätsbereinigter extrahierbarer nukleärer Antigene beschichtet, die im System als Antigen-Substrat dienen. 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 an Meerrettich-Peroxidase konjugierten anti-Human-Antikörper, gebunden an einen Human-Anti-ENA-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 H₂O₂ als chromogenes Substrat nachgewiesen. Der Grad der Farbentwicklung in den Kavitäten ist proportional zur Konzentration von anti-ENA-Antikörpern 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 extrahierbarem nukleärem Antigen beschichtete Mikrotiterplattenstreifen **PLATE**: Katalognummer 7008-10.

Ein Mikrotiterplattenrahmen mit zwölf Streifen je acht Kavitäten, mit einer Mischung aus sieben stabilisierten affinitätsbereinigten extrahierbaren nukleären Antigenen beschichtet (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Scl-70 und Jo-1). Diese Streifen sind braun farbcodiert. Es wird je ein kompletter Streifen für eine Kontrolle oder eine Patientenprobe benötigt. Unbenutzte Streifen können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

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

Enzym-Antikörper-Reagens - spezifisch für schwere und leichte Ketten aus Human-IgG **CONJ|HRP**: Katalognummer 7009-10 (14 ml). Anti-Human-IgG (H&L), an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens.

Substratlösung **SOLN|SUB**   : Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-spezifische Enzymsubstratlösung, enthält stabilisiertes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). 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.

Stopplösung **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.

ENA Kalibratorserum **CAL**: Katalognummer 7026-10 (2 ml). Menschliches Serum, das Antikörper gegen ein oder mehrere extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und/oder Jo-1 enthält. Der Testwert für dieses Serum ist auf dem Flaschenetikett eingetragen. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

ENA-Positivkontrolle **CONTROL|+**: Katalognummer 7021-10 (2 ml). Human-Positivkontrollserum, das Antikörper gegen ein oder mehrere extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und/oder Jo-1 enthält. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

ENA-Negativkontrolle **CONTROL|-**: Katalognummer 7031 (2 ml). Human-Negativkontrollserum, das keine Antikörper gegen Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und Jo-1 enthält. Das Serum ist gebrauchsfertig verdünnt.

Optionale unverdünnte ENA-Positivkontrolle **OPT+**: Katalognummer 7022-10 (0,25 ml). Human Positivkontrollserum, das Antikörper gegen ein oder mehrere extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und/oder Jo-1 enthält. Die Positivkontrolle ist als unverdünntes Serum zu verwenden.

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 Waschsysteem 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
Laborstoppuhr

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 Kontrollseren, Kalibratorseren und Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potentiell 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. Die Kontroll- und Kalibratorseren enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid (0,09%). Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
4. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
5. Die für RELISA® ENA Screening-Tests vorgesehenen Serumproben nicht durch Hitzeeinwirkung deaktivieren. Inaktivierung durch Hitze kann erhöhte Werte zur Folge haben.
6. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
7. 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.
8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Während der Tests müssen die Proben in den Kavitäten der Mikrotiterplatten verbleiben.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Mikrotiterstreifen und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
16. 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.

ACHTUNG: Die für RELISA® ENA Screening-Tests vorgesehenen Serumproben nicht durch Hitzeeinwirkung deaktivieren. Inaktivierung durch Hitze kann erhöhte Werte zur Folge haben.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum 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. Seren dürfen 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 Waschergeräts 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 in der Luft kräftig ausgeschlagen und auf Papierhandtuch 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.
2. Die spezifische Antikörperkonzentration des Kalibratorserums (auf dem Etikett vermerkt) wird durch den mittleren Absorptionswert der Kalibratorkavitäten dividiert, um den Konvertierungsfaktor zu ermitteln.
3. Die Absorptionswerte jeder Probe werden mit dem Konvertierungsfaktor multipliziert, um die spezifische Antikörperkonzentration zu ermitteln.
4. Die Formel für diese Berechnung lässt sich vereinfacht wie folgt ausdrücken:

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

U_c = Kalibratorwert (Einheiten)

λ_c = Absorption des Kalibrators*

λ_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

1. 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 Zimmertemperatur (18-25°C) erwärmen lassen und den Lauf wiederholen, wobei besonderes Augenmerk auf den zeitlichen Ablauf der einzelnen Schritte zu legen ist.

2. Die leere Kontrollkavität muss einen Absorptionswert von unter 0,150 haben. Höhere Absorptionsleerwerte als 0,150 sind als Hinweis auf unzureichendes Waschen oder Kontamination der Reagenzien zu interpretieren.
3. 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.
4. Der Konvertierungsfaktor muss für jeden Durchlauf separat berechnet werden. Wenn ein Konvertierungsfaktor aus einem anderen Durchlauf verwendet wird, werden die Ergebnisse unbrauchbar.
5. Jedes Labor muss seine eigenen (normalen) Referenzwerte auf der Basis der Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren festlegen.
6. Human-Positivkontrollserum, das Antikörper gegen ein oder mehrere extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und/oder Jo-1 enthält. Dies ist eine qualitative Kontrolle, die einen Wert von mehr als 20 ENA-Einheiten liefern sollte.
7. Das Negativkontrollserum ist ein Pool von Humanserum, das keine Antikörper gegen eines der sechs Autoantigene in diesem Test enthält. Dies ist eine qualitative Kontrolle, die kleinere Werte als 20 ENA-Einheiten ergeben sollte.
8. Das unverdünnte Positivkontrollserum ist ein menschliches Serum, das Antikörper gegen ein oder mehrere extrahierbare nukleäre Antigene vom Typ Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 und/oder Jo-1 enthält. Diese Kontrolle sollte einen Wert von mehr als 20 ENA Einheiten.
9. Wenn der Kontrollwert außerhalb des zulässigen Bereichs liegt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

1. 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. Die PatientenprobeKavitäten, deren errechnete Werte höher als oder gleich 25 ENA-Einheiten sind, sind als positiv zu werten und sollten auf ihre ENA-Spezifität getestet werden. Die PatientenprobeKavitäten, deren errechnete Werte niedriger als 20 ENA-Einheiten sind, sind als negativ zu werten. Werte zwischen 20 und 25 Einheiten liegen im positiven Grenzbereich und sollten wiederholt oder einzeln auf ihre ENA-Spezifität getestet 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 Testumständen (wie Temperatur und zeitliche Abfolge der Schritte.)
2. Da der RELISA[®] ENA Einzel-Screening-Test verschiedene Antigene enthält, stellen die Ergebnisse eine Zusammenfassung der Antikörperreaktionen auf jedes der sechs Antigene dar. Wenn verschiedene Autoantikörper in niedriger Zahl vorhanden sind, kann der RELISA[®] ENA Einzel-Screening-Test zu einem positiven Ergebnis führen, die Spezifität einzelner Autoantikörper kann jedoch unter dem jeweiligen Cutoff-Wert liegen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Testergebnis ist als positiv oder negativ für Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene anzugeben. Die Zahl der Antikörper hat keine bekannte klinische Bedeutung.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises von Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene 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 Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene 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. Bei einigen Patienten mit Autoimmunerkrankungen können nicht nachweisbare oder unbedeutende Mengen Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene vorhanden sein; bei anderen Patienten mit großen Mengen an Antikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene sind u.U. nur geringfügige oder keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung festzustellen. Der Arzt muss die Ergebnisse des Tests auf Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
4. Die mit diesem Testsystem nachgewiesenen Antikörperwerte lassen nicht unbedingt auf die Schwere oder Dauer einer Erkrankung schließen.

ZU ERWARTENDE WERTE

Die Häufigkeit von Autoantikörpern gegenüber verschiedenen nukleären Antigenen variiert je nach Patientenpopulation sowie nach der Häufigkeit klinischer Rheumaerkrankungen in dieser Population. Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern und spezifischen Rheumaerkrankungen ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Antikörper gegen:	Assoziierte Erkrankung:
Sm	Hoch-spezifischer Marker-Antikörper, der bei 25-30% der SLE-Patienten auftritt
U1-RNP	Gemischte Bindegewebskrankheit >95%; SLE 35%; weniger häufig bei discoidem Lupus oder progressiver systemischer Sklerose (PSS)
SSA/Ro	Sjögren-Syndrom 60-70%; SLE 50%
SSB/La	Sjögren-Syndrom 40-50%; SLE 15%
Scl-70	Hoch-spezifischer Marker-Antikörper, der bei 15-20% der PSS-Patienten auftritt
Jo-1	Hoch-spezifischer Marker-Antikörper, der bei 25-30% der Patienten mit Polymyositis oder Dermatomyositis auftritt

REFERENZBEREICH

Der Referenzbereich wurde durch Tests an Seren von 403 gesunden Blutspendern, 205 Frauen und 198 Männer, ermittelt. Bei keinem der Spender war eine rheumatische Erkrankung bekannt. Auf Basis dieser Daten wurden die normalen Cutoff-Werte, weniger als 20 ENA-Einheiten, berechnet. Die gute Laborpraxis schreibt vor, dass jedes Labor seine eigenen normalen Wertebereiche auf Basis der Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren ermitteln muss.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

Der RELISA® Einzel-ENA-Screening-Test von Immuno Concepts wurde mit dem Immuno Concepts RELISA® Multiparameter-ENA-Screening-Test verglichen. Die studierte Patientenpopulation bestand aus 50 Patienten, welche die Kriterien für eine Diagnose von systemischem Lupus erythematosus erfüllten, 25 Patienten mit Autoimmun-Myositis oder Myositis-überlappenden Syndromen, 23 Patienten mit diagnostizierter Sklerodermie oder progressiver systemischer Sklerose, 21 Patienten mit Sjögren-Syndrom, 3 Patienten mit diagnostizierter rheumatoider Arthritis, 18 Patienten mit undifferenzierter Bindegewebskrankheit und 403 Personen, bei denen keine bekannte Autoimmunerkrankung vorlag. Auf Basis dieses Vergleichs wurden die folgenden Daten aufgestellt. Tabelle 2.

Immuno Concepts RELISA® Einzel- Screening-ENA Test	Immuno Concepts RELISA® Multiparameter ENA Screening Test		
	Positiv	Grenzwert	Negativ
Positiv	126	9	5
Grenzwert	0	2	4
Negativ	1	2	394

Ergebnisse im Grenzbereich wurden als positiv gewertet. Aus diesen Daten ergeben sich die folgenden statistischen Werte: relative Sensitivität, 97,9%; relative Spezifität, 97,8% sowie Gesamtübereinstimmung, 97,8%.

REPRODUZIERBARKEIT

Sechs positive Proben und fünf negative Proben wurden auf drei verschiedenen Chargennummern von Antigen-Streifen bei drei verschiedenen Gelegenheiten getestet. In keinem Fall wies eine negative Probe positive Ergebnisse auf, die positiven Proben lieferten durchwegs deutlich positive Ergebnisse.

BIBLIOGRAPHIE

- Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- 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). 52:148-159, 1972.
- Sharp, G.C., Irwin, May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm Antigens with mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Other Rheumatic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
- Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
- Alspaugh, M.A., Talal, N., and Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- Nishikai, M. and Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear Non-histone Basic Protein (Mi-1) which reacts with Anti-immunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17: 1129-1141, 1980.
- Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
- Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzler, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
- Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
- Fritzler, M.J. and Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases, p. 207-247. In Cohen, A.S. (ed.), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*. Grune and Stratton, Orlando, FL, 1985.
- Tan, E.M. and Kunkel, H.G. Characteristics of a Soluble Nuclear Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
- Winfield, J.B., Brunner, C.M., and Koffler, D. Serological Studies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Central Nervous System Dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
- Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
- Hamburger, M., Hodes, S., and Barland, P. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Am. J. Med. Sci.* 273:21-28, 1977.
- Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
- Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewolski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
- Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
- Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
- Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
- Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
- Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
- Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
- Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
- Wasicek, C.A. and Reichlin, M. Clinical and Serological Differences Between Systemic Lupus Erythematosus Patients with Antibodies to Ro versus Patients with Antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69:835-843, 1982.
- Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
- Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease – A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
- Guldner, H.H., Szostek, C., Vosberg, H.P., et al. Scl 70 Autoantibodies from Scleroderma Patients Recognize a 95 kDa Protein Identified as DNA Topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138, 1986.
- Jarzabek-Chorzelska, M., Blaszczyk, M., Jablonska, S., et al. Scl 70 Antibody-A Specific Marker of Systemic Sclerosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:393-401, 1986.
- Bernstein, R.M., Morgan, S.H., Chapman, J., et al. Anti-Jo-1 Antibody: A marker for Myositis with Interstitial Lung Disease. *Brit. Med. J.* 289:151-152, 1984.

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

RELISA® ENA EINZEL-SCREENING 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 verschlossen 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 ENA-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 Klebestreifen 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: +1-916-363-264
oder via E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com