



RELISA[®] ENA Sm RNP SSA/Ro SSB/La Scl-70 Jo-1 SCREENINGTEST AV MULTIPARAMETERANTIKROPP

För diagnostisk användning in vitro

För yrkesmässigt bruk

Katalognummer: 7096-09 (96 brunnarna) och 7696-09 (576 brunnarna)

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är enzymimmunanalis-system (EIA) för detektion av antikroppar mot de extraherbara nukleära antigenerna Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och Jo-1 i humanserum. Resultaten av denna analys kan användas som ett hjälpmedel vid diagnostisering av autoimmuna sjukdomar.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antikroppar mot extraherbara nukleära antigener (ENA) har associerats med flera autoimmuna syndrom och verkar vara av diagnostisk och/eller prognostisk betydelse vid systemisk skleros (1, 2), blandad bindvävssjukdom (3-5), Sjögrens syndrom (6, 7), polymyosit (8), dermatomyosit (9), systemisk lupus erytematosus (5) och reumatoid artrit (10). Det antinukleära antikroppstestet (ANA) har använts som ett filter för dessa antikroppar, men ANA anger inte antikroppens specificitet, och antikroppar mot vissa ENA ger inte positivt ANA-svar (11, 12). Därför rekommenderas bestämt en andra bekräftande analys av antikroppar mot ENA (13).

Sm-antigenen (Smith) identifierades 1966 av Tan och Kunkel som ett i saltlösning lösligt icke-histonglykoprotein som inte är beroende av DNA eller RNA för sin antigena potential (14). Antikroppar mot Sm-antigen betraktas som en specifik serologisk markör på grund av sin höga specificitet för systemisk lupus erytematosus (SLE). Dessa antikroppar har noterats hos upp till 30 procent av SLE-patienter och associerats med aktiv njursjukdom och cerebrit (15-17).

Antikroppar mot Sm-antigen påträffas ofta tillsammans med U1-RNP-antikroppar i sera hos patienter med SLE (18, 19). Till skillnad från antikroppar mot Sm-antigen betraktas antikroppar till RNP inte som en specifik serologisk markör, eftersom de påträffas hos patienter med olika reumatiska sjukdomar, t ex SLE, sklerodermia, Sjögrens syndrom och reumatoid artrit. Emellertid associeras hög antikroppnivå av RNP med ett överlappande syndrom som kallas blandad bindvävssjukdom (MCTD). Patienter med MCTD karaktäriseras av en kombination av sjukdomssymptom liknande de som påträffas vid SLE, sklerodermia och polymyosit. Sådana patienter reagerar ofta väl på kortikosteroidbehandling och har färre njursjukdomar jämfört med SLE-patienter (20, 21).

SSA och SSB beskrevs ursprungligen som nukleära RNA-proteinantigener hos patienter med Sjögrens syndrom (6, 7). Ro och La beskrevs som cytoplasmiska RNA-proteinantigener hos patienter med SLE (22, 23). Det är i dag vida accepterat att såväl SSA och Ro som SSB och La är likartade, och att dessa antigener påträffas i både kärnan och cytoplasman. Antikroppar mot enbart SSA/Ro eller SSA/Ro och SSB/La påträffas hos 62 procent av patienter med subakut kutan lupus (24) och hos 85 procent av patienter med Sjögrens syndrom som utvecklar vaskulit (25). Antikroppar mot enbart SSA/Ro påträffas hos patienter som har homozygot brist på C2-komplementfragment (26), patienter med primär biliär cirros som utvecklar Sjögrens syndrom (27) samt hos högst två tredjedelar av patienter med "ANA-negativ SLE" (28). SSA/Ro autoantigen är ett komplex av Ro60 protein och Ro52 protein med små ribonukleoproteiner. Detta komplex är ibland kallat "SSA/Ro60 protein hY-RNA komplex", och även innehåller SSB/La protein. Ro60 är starkt förknippat med SSA/Ro hY-RNA komplexet, men Ro52 är endast svagt förknippat med komplexet (29).

Scl-70-antigenen har identifierats som ett cellformigt enzym, DNA topoisomeras I (30). Antikroppar mot Scl-70 har rapporterats hos upp till 56 procent av patienter med progressiv systemisk skleros (PSS), framför allt den delmängd av patienterna som har diffus sklerodermia (31). Dessa autoantikroppar betraktas som en markör för PSS, eftersom de inte påträffas vid andra bindvävssjukdomar.

Antikroppar mot Jo-1, vilket är den cellformiga enzymhistidyl-TRNA-syntetasen, påträffas hos 25-30 procent av patienter med polymyosit eller dermatomyosit, men inte vid andra myopati (11, 32). Anti-Jo1-antikroppar har också visat sig vara starkt associerade med interstitiell lungsjukdom, t ex i samband med myosit (32).

TESTPRINCIP

Detta test är en kvalitativ indirekt EIA. Mikrobrunnarnas yta har täckts med stabiliserade preparat av affinitetsrenade extraherbara nukleära antigener och fungerar som ett antigensubstrat i detta system. Spädningar av patientproven placeras i mikrobrunnarna och odlas så att de specifika antikropparna i provet reagerar med antigenen i den fasta fasen. Efter tvättning för att avlägsna obunden antikropp och annat seraprotein odlas brunnarna med getantihumana antikroppar märkta med pepparrotperoxid. Det pepparrotperoxidaskonjugerade antikropppreparat som ingår i detta testsystem är specifikt för humana IgG-tunga och -lätta kedjor.

Om resultaten är positiva efter inkubation med pepparrotperoxidaskonjugat bildas ett stabilt komplex bestående av tre delar. Detta komplex består av antihuman antikropp konjugerad med pepparrotperoxid bunden till human anti-ENA-antikropp, vilken i sin tur är bunden till den antigen som stabiliserats på plastytan.

Efter ännu ett tvättsteg detekteras detta komplex genom att tillsättande av en lösning av tetrametylbensidin (TMB) och H₂O₂ som kromogent substrat. Graden av färgutveckling i varje brunn står i relation till koncentrationen av anti-ENA-antikropp i respektive serumprov. Varje mikrobrunn avläses i spektrometer vid 450 nm.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM MEDFÖLJER

Förvaring: Alla komponenter skall kylförvaras i 2-10°C. Får ej frysas.

Stabilitet: Alla komponenter förblir stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd inte komponenterna efter utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Extraherbara nukleära antigen kotade mikrotiterbrunnar på strips: Katalognummer 7008-09. En mikrotitbrunn ram innehållande tolv åtta brunnars strips kotade med stabiliserade lösningar av likhet renad extraherbar atomär antigen. En åtta brunn strip används för varje kontroll eller patient prov. Oanvända strips kan förvaras i foliepåsen i kyla upp till 45 dagar.

Provspädningsvätska: Katalognummer 7015 (14 ml). Patentskyddad buffrad provspädningsvätska för spädning av patientprover.

Enzymantikroppreagens - human IgG tung- och lättkedjespecifik: Katalognummer 7009-09 (14 ml). Getantihuman IgG (H och L) konjugerad med pepparrotperoxid (HRP). Reagensen är bruksfärdig.

Substratlösning: Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning innehållande stabiliserad 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H₂O₂). Reagensen är bruksfärdig.

Stoppreagens: Katalognummer 7033 (14 ml). Patentskyddad stoppreagens för Immuno Concepts EIA-testsystem. Reagensen är bruksfärdig. **WARNING:** Frätande. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra vid ögonen i samband med hantering skall du omedelbart spola noggrant med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten till denna reagens.

Multiparameter ENA-positiv kontroll: Katalognummer 7021-09 (2 ml). Humant positivt kontrollserum bestående av antikroppar mot Sm-, RNP-, SSA/Ro-, SSB/La-, Scl-70- och Jo-1-antigener. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

ENA-negativ kontroll: Katalognummer 7031 (2 ml). Humant negativt kontrollserum som inte innehåller antikroppar mot Sm-, RNP-, SSA/Ro-, SSB/La-, Scl-70- eller Jo-1-antigener. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

Hållare för mikrobrunnar

Tvättbuffertlösning:

PBS-buffert: Katalognummer 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0.01 M, pH 7,4 ± 0,2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge en liter. (Två påsar buffertpulver medföljer varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

Tvättbuffertkoncentrat: Katalognummer 1031 (10 ml). 5% Tween-20-lösning för användning i tvättbufferten. (Två ampuller med buffertkoncentrat levereras för varje 96-mikrobrunnspatta i kompletta testsatser).

Framställning: Lös upp en påse med buffertpulver i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska tvättbuffertkoncentrat i den upplösta fosfatbuffrade saltlösningen. Blanda väl och förvara i kylskåp i 2-10°C i upp till fyra veckor eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar. Tvättbuffertlösning måste stå i rumstemperatur (18-24°C) före användning.

ÖVRIGHT MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

Volymetriska precisionspipetter för pipettering av 25-1000 µl volymer

Klämflaska för pipettering av tvättbuffertlösning till mikrobrunnarna eller till ett automatiserat eller halvautomatiserat tvättsystem för mikrobrunnar

Enlitersbehållare för PBS-tvättbuffertlösning

Avjoniserat eller destillerat vatten

Plattläsningspektrometer som kan avläsa absorption vid 450 nm

Provrör för framställning av serumspädningar

Läskpapper eller pappershanddukar

Multikanalspipett som kan pipettera 8 brunnar

Engångshandskar

Laboratorietidur

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Allt material av humant ursprung som använts i denna produkt har testats med FDA-godkända metoder och visade sig reagera negativt (inte upprepat reaktivt) på antikroppar mot humant immunbristvirus-1 (HIV-1), humant immunbristvirus-2 (HIV-2), hepatit C-virus (HCV) och hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit-C, hepatit-B, eller andra smittämnen. Därför skall allt satsmaterial hanteras som potentiellt smittsamt.
- Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitutets manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
- Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
- Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel i kontrollserat. Natriumazid kan reagera med ledningsrör av bly eller koppar och bilda högexplosiva metallazider. När reagenser kasseras skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att skölja bort eventuella rester i avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
- Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
- Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.
- Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prov eller satsreagenser hanteras.
- Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
- Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
- Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat. Proverna måste hållas instängda i mikrobrunnarna under analysen.
- Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
- Placera alla reagenser, mikrobrunnar och prover i rumstemperatur (18-24°C) före användning.
- Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
- Mikrobisk kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
- Stoppreagensen är frätande och kan orsaka brännskador. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra ögonen vid hantering skall du omedelbart spola med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten i denna reagens.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-24°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys.

Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till avvikande resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före testning.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10°C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare, skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerum.

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge falskt positiva eller negativa resultat.

ALLMÄNNA PROCEDURANVISNINGAR

1. Det är ytterst viktigt att alla satskomponenter och serumprov står i rumstemperatur (18-24°C) före användning. En hel liter tvättbuffert kan ta flera timmar att värma till 20°C sedan den har tagits ur kylskåpet. Inkubationstemperaturer som ligger högre eller lägre än det angivna intervallet kan leda till felaktiga resultat. Sätt tillbaka oanvända prover och reagenser i kylförvaring efter användning.
2. Blanda reagenserna väl före användning genom försiktig inversion. Snurra eller rotera inte reagenserna. Undvik skumning.
3. När provspädningarna framställs skall pipettspetsarna torkas av innan serum dispensereras i en provspädning. Överflödigt prov som sitter fast på utsidan av pipettspetsen påverkar resultaten.
4. Vi rekommenderar att en multikanalpipett används eftersom detta ger mer enhetliga reagensdispenserings, inkubationstider och reaktionstider.
5. **Det är ytterst viktigt att brunnarna tvättas ordentligt.** Otillräckligt tvättade brunnar leder till höga bakgrundsvärden och kan ge falskt positiva resultat. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättbuffert. Om det automatiserade tvättsystemet för mikrobrunnar används blir brunnarna blir ordentligt tvättade, varför detta rekommenderas. **OBSERVERA:** Då det finns olika tvätteknycktyper och automatiserade program kan antalet tvättar behöva justeras för optimala resultat. Varje laboratorium bör bestämma det mest effektiva antalet tvättar för sitt tvättsystem.
6. Om den resterande tvättbufferten inte avlägsnas ordentligt kan detta leda till ojämn färgutveckling. Mikrobrunnstremsorna skall läskas på absorberande papper eller handdukar för att minimera mängden kvarvarande tvättbuffert.
7. Det är av avgörande betydelse att samtliga steg sker i rätt tid. Samtliga serumprover skall spädas innan proceduren påbörjas och de måste dispensereras till mikrobrunnarna på så kort tid som möjligt (högst fem minuter). Batcharnas storlek skall väljas så att provhanteringen går så smidigt som möjligt under denna tidsperiod. Prov- och reagenshanteringen underlättas med hjälp av en multikanalpipett, varför detta rekommenderas.
8. Med undantag för den sista inkuberingen (substratlösning) börjar varje inkubationstid med att prov eller reagenser dispensereras. Inkubationen av substratlösningen måste vara exakt 30 minuter för varje brunn. Alla prover och reagenser skall dispensereras i samma ordningsföljd och med en konstant hastighet.

TOLKNING AV RESULTAT

KVALITETSKONTROLL

1. Ämneskontrollbrunnen skall ha ett absorptionsvärde som understiger 0,250. Ämnesabsorptionsvärden större än 0,250 tyder på otillräcklig tvättning eller kontamination av reagenser.
2. Absorptionsavläsningen av ämneskontrollbrunnen (rad A) dras ifrån absorptionsavläsningarna för RELISA[®] procedurkontrollbrunn (RPC) (rad B) och respektive antigenbrunn (raderna C till och med H). Nettovärden som är lägre än noll betraktas som nollvärden.

3. RELISA[®] procedurkontrollbrunn (RPC) (rad B) skall ha en nettoabsorption större än 0,300. Absorptionsvärden som är lägre än 0,300 betyder att färgutvecklingen varit otillräcklig och serien är ogiltig. Otillräcklig färgutveckling beror vanligtvis på att kalla reagenser har använts eller att tidpunkten för ett eller flera steg i analysen varit felaktigt vald. Låt reagenserna värmas till rumstemperatur (18-24°C) och upprepa serien med särskild uppmärksamhet på valet av tidpunkt för alla steg.
4. Alla nettoabsorptionsvärden multipliceras med 100 för att få fram värdet för respektive antigen i ENA-enheter.
5. Det positiva kontrollserumet är en samling humanserum bestående av antikroppar mot alla sex autoantigenerna i detta test. Varje antigenbrunn skall uppvisa ett värde på 30 ENA-enheter eller mer.
6. Det negativa kontrollserumet är en samling humanserum som inte innehåller antikroppar mot någon av de sex autoantigenerna i detta test. Varje antigenbrunn skall uppvisa ett värde på mindre än 20 ENA-enheter.
7. Varje laboratorium skall fastställa en frekvens för positiva och negativa kontroller baserat på förekomsten av patienttester och laboratoriets erfarenhet av denna analys.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

1. Detta är en kvalitativ analys. De antikroppnivåer som detekteras har ingen känd klinisk signifikans och de enhetsvärden som erhållits i denna analys har endast beräknats för att dela in patienterna i följande breda grupper. Patientprovbrunnar som har beräknade värden större än 30 ENA-enheter betraktas som positiva. Patientprovbrunnar som har beräknade värden mindre än 20 ENA-enheter betraktas som negativa. Värden mellan 20 enheter och 30 enheter betraktas ligga på gränsen till att vara positiva. Analysen skall göras om. Varje laboratorium måste fastställa ett eget referensintervall och egna frånslagsvärden baserat på analyserad patientpopulation. Enhetsvärdena påverkas av patientfaktorer, mekaniska överväganden (t ex pipetteringsprecision och exakthet) och analysvillkor (t ex temperatur och val av rätt tidpunkt för ett visst steg).
2. Sm- och Sm/RNP-brunnarna används tillsammans för att fastställa förekomsten av dessa två autoantikroppar. Om Sm/RNP-brunnen är positiv och Sm-brunnen är negativ har patienten antikroppar mot RNP. Om båda brunnarna är positiva och har så gott som lika värden har patienten antikroppar mot Sm. Om båda brunnarna är positiva och Sm/RNP-brunnen är 30 ENA-enheter eller högre än Sm-brunnen tyder detta på förekomst av både Sm- och RNP-autoantikroppar. Om både Sm- och Sm/RNP-brunnarna är vid, eller nära dess maximumabsorbans, kan det finnas en förlust av den avskiljande egenskapen mellan Sm-brunnen och Sm/RNP-brunnen. I denna situation kan man inte längre avgöra om RNP antikroppar finns eller ej genom att subtrahera Sm- värdet från Sm/RNP-värdet. Förekomsten av båda antikropparna kan bekräftas med hjälp av Immuno Concepts AUTO-ID[®] immundiffusionssystem, katalognummer 6030.
3. De övriga brunnarna är belagda med affinitetsrenade monospecifika antigener och reagerar endast på den homologa antikroppen. SLE och andra autoimmuna syndrom har emellertid patientsera med flera antikroppspecifiteteter, och därför kan ett enskilt serum uppvisa en positiv reaktion i mer än en brunn.
4. Brunnarna är belagda med affinitetsrenade antigener i följande ordning: Från toppen (brunn A och den solida flikänden på remsan) till botten (brunn H och den naggade flikänden på remsan):

Brunn A – Ämneskontrollbrunnen
Brunn B – RELISA[®] Procedurkontrollbrunn (RPC)
Brunn C – Sm
Brunn D – Sm/RNP
Brunn E – SSA/Ro (Ro60 and Ro52)
Brunn F – SSB/La
Brunn G – Scl-70
Brunn H – Jo-1

RAPPORTERING AV RESULTATET

Resultat skall rapporteras som positiva eller negativa för respektive antikroppar mot extraherbara nukleära antigener. Antikroppnivåerna har ingen känd klinisk betydelse.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Förekomsten av autoantikroppar mot olika nukleära antigener varierar beroende på patientpopulation och förekomsten av kliniska reumatiska sjukdomar i denna. Sambandet mellan antikroppar och specifika reumatiska sjukdomar har sammanfattats i nedanstående tabell 1.

Tabell 1

Antikroppar mot:	Sjukdomssamband:
Sm	Mycket specific marköantikropp påträffade hos 25-30% av SLE-patienterna
U1-RNP	Blandad bindvävssjukdom >95%; SLE 35%; lägre frekvens vid skivformig lupus eller progressiv systemisk skleros (PSS)
SSA/Ro	Sjögren's Syndrom 60-70%; SLE 50%
SSB/La	Sjögren's Syndrom 40-50%; SLE 15%
Scl-70	Mycket specific marköantikropp påträffade hos 15-30% av PSS-patienterna
Jo-1	Mycket specific marköantikropp påträffade hos 25-30% av patienter med polymyosit eller dermatomyosit

REFERENSINTERVALL

Referensintervallet upprättades genom att testa sera från 206 friska blodgivare, 105 kvinnor och 101 män, av vilka ingen veterligen hade haft någon reumatisk sjukdom tidigare. Dessutom hade data erhållits från 143 patienter med reumatiska sjukdomar som hade antikroppar mot en eller flera av antigenerna i denna analys, men som reagerade negativt på antikroppar mot andra antigener. Baserat på dessa data upprättades de normala frånslagsvärdena som mindre än 20 ENA-enheter. God laboratoriepraxis föreskriver att varje laboratorium skall fastställa sina egna normala spridningsområden baserat på patientpopulation och andra lokala faktorer.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av antikroppar mot extraherbara nukleära antigener. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens tidigare sjukdomar och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antikroppar mot extraherbara nukleära antigener. Kliniska indikationer, andra laborieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
3. Vissa patienter med autoimmuna sjukdomar kan ha obetydliga nivåer av antikroppar eller nivåer som är omöjliga att upptäcka, medan andra personer kan ha höga nivåer av antikroppar mot extraherbara nukleära antigener, men få eller inga tecken på klinisk sjukdom. Läkaren måste tolka testresultaten för antikroppar mot extraherbara nukleära antigener med hänsyn till patientens tidigare sjukdomar och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
4. De antikroppnivåer som detekteras med detta testsystem visar inte nödvändigtvis sjukdomens svårighetsgrad eller varaktighet.

PRESTANDA

Immuno Concepts screeninganalys RELISA[®] jämfördes med andra liknande ELISA-analyser på marknaden, med dubbla immundiffusions- och kontraimmunelektroforestester som gjorts i referenslaboratorier och med immunoblot (Western Blot)-resultat som erhållits med en intern metod. Resultaten av alla metoder och den kliniska diagnosen av patienten togs med i beräkningen när förväntade eller "korrekta" resultat testades för varje prov. Följande data erhöles med utgångspunkt från jämförelser. Tabell 2.

Tabell 2

Antikroppar mot:	Relativ Sensitivitet	Relativ Spezifitet	Total Överensstämmelse
Sm	97,0%	95,5%	95,8%
Sm/RNP	94,8%	94,1%	94,4%
SSA/Ro	100%	83,3%	96,5%
SSB/La	100%	95,9%	97,9%
Scl-70	100%	100%	100%
Jo-1	100%	100%	100%

Skilnaderna i specificitet beror på den ökade sensitiviteten hos ELISA-analyser jämfört med "traditionella" metoder, exempelvis kontraimmunelektrofores och immundiffusion.

KORSREAKTIVITET

Sju prover användes för studier av korsreaktivitet. Dessa prover karaktäriserades väl av Western Blot, CIE och immundiffusion som monospecifika sera för var och en av autoantikropparna i screeningstestet RELISA®. Ingen korsreaktivitet noterades i något av dessa prov. Tabell 3.

Tabella 3

Prov	Antigener					
	Sm	Sm/RNP	SSA/Ro	SSB/La	Scl-70	Jo-1
Anti Sm	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Anti RNP	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Anti Sm/RNP	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Anti SSA/Ro	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
Anti SSB/La	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Anti Scl-70	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Anti Jo-1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS

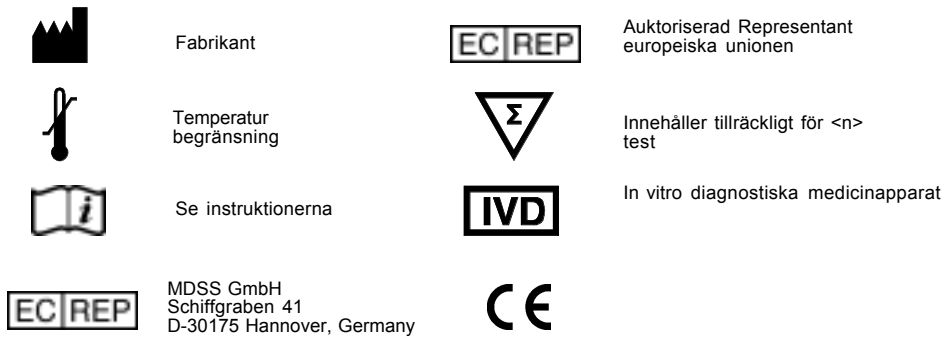
REPRODUCERBARHET

För var och en av de sex antigenspecificiteterna kördes sex prover med tre olika lotnummer av antigenremсор vid tre olika tillfällen. Två av proverna var negativa, men låg nära frånslagsvärdet 20 ENA. Två prover var positiva, men låg nära frånslagsvärdet 20 ENA och två prover låg klart positivt över nivån 30 ENA. I inget av fallen gav ett negativt prov positiva resultat. Alla "gränfallspositiva" prover gav överlag resultat mellan 20 och 30 ENA-enheter och de klart positiva proven gav klart positiva svar.

BIBLIOGRAFI

1. 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.
2. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. 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.
5. 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.
6. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
7. 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.
8. Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
17. 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.
18. 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.
19. Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewski, 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.
20. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
21. Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA/Ro) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
26. Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA/Ro) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
27. 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.
28. Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
29. Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease - A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsföpackningen är skadad.



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

Cat 7096-09-I,

4.11.02.003.100-Sv

Rev 5.0 © Copyright 2011

IVD-direktiv (2001/59/EG) riskfraser



REF 7035: Substratlösning

R23/ 24/ 25	Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R39/ 23/ 24/ 25	Giftigt: risk för mycket allvarliga bestående hälsoskador vid inandning, hudkontakt och förtäring.
S1/2	Förvaras i låst utrymme och oåtkomligt för barn.
S7	Förpackningen förvaras väl tillsluten.
S36/ 37	Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar.
S45	Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

RELISA® ENA TEST PROCEDUR

Alla prover, reagenser (inklusive tvättbuffertlösningen) och mikrobrunnar måste stå i rumstemperatur före användning.

- 1. IORDNINGSTÄLLANDE AV ARBETSBLAD**
Märk det arbetsblad som medföljer satsen för att ange identifieringen för varje åttabrunnarsremsa med mikrobrunnar.
- 2. FRAMSTÄLLNING AV TVÄTTBUFFERTLÖSNING (PBS Tween)**
Lös upp innehållet i en PBS-buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Tillsätt hela innehållet i en flaska med tvättbuffertkoncentrat i den upplösta fosfatbuffrade saltlösningen i en enlitersbehållare. Blanda väl. Tvättbuffertlösningen kan täckas och förvaras i 2-10°C i högst fyra veckor.
- 3. SPÄDNING AV PROVER**
Späd patientproverna till 1:40 genom att tillsätta 25 µl serum till 975 µl provspädningsvätska. Blanda väl. Kontrollerna tillhandahålls färdigspädda och behöver inte spädas ytterligare.
- 4. FÖRBERED MIKROTITERBRUNNAR**
Ta bort det begärda antalet mikrotiter strips från påsen och placera dem i ramhållaren. Mikrotiter stripen måste fästas stadigt i ramhållaren. Tryck bestämt ner i båda ändarna av stripen så de säkert fäster i ramhållaren. Brunnar som är ordentligt på plats i ramhållaren trillar inte ut när ramhållaren är omvänd. Oanvända brunnar kan förvaras i foliepåsen förseglad och kylt i upp till 45 dagar.
- 5. DISPENSERING AV SERUMSPÄDNINGAR**
Dispensera 100 µl spätt patientprov i var och en av de åtta brunnarna i en multiparameterremsa.
- 6. INKUBATION AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)**
Odlia i rumstemperatur i 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Remsorna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem mot damm och andra främmande ämnen.
- 7. TVÄTTNING AV REMSOR (se „Allmänna proceduranvisningar“ 5 och 6)**
Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättbuffert.
- 8. DISPENSERING AV ENZYMAKROPPREAGENS**
Dispensera 100 µl enzymantikroppreagens i varje brunn.
- 9. INKUBATION AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)**
Odlia i rumstemperatur i 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Remsorna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem mot damm och andra främmande ämnen.
- 10. TVÄTTNING AV REMSOR**
Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS-Tween tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa fyll- och torkstegen för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättbuffert.
- 11. DISPENSERING AV SUBSTRATLÖSNING**
Förvissa dig om jämna tidsintervall med hjälp av ett tidur och dispensera 100 µl substratlösning i varje brunn. Substratlösningen måste tillsättas i brunnarna i en jämn hastighet så att varje brunn inkuberas exakt lika länge (30 minuter). Substratlösningen i brunnar som inkuberas med positiva prover blir blå, medan lösningen i brunnar som inkuberas med negativa prover blir färglösa eller mycket svagt blå.
- 12. INKUBATION AV REMSOR (exakt 30 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24°C)**
Odlia i rumstemperatur i exakt 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden.
- 13. DISPENSERING AV STOPPREAGENS**
När den första brunnen har inkuberats i exakt 30 minuter skall 100 µl stoppreagens tillsättas i varje brunn, i samma ordningsföljd och med samma hastighet som substratlösningen tillsattes i brunnarna. När stoppreagens tillsätts skiftar den blå substratlösningen till gult, medan den färglösa lösningen förblir färglös.
- 14. LÄSNING AV BRUNNARNAS ABSORPTION**
Brunnarna måste avläsas i plattläsande spektrofotometer inom 30 minuter efter tillsättning av stoppreagens. Brunnarna avläses vid 450 nm mot ämneskontrollbrunnen. Om spektrofotometer med dubbla våglängder används skall referensfiltrets våglängd ställas in på 600-650 nm. Avläsning av mikrobrunnarna utan referensfilter ger högre absorptionsvärden.

TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649
eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

