

RELISA® ENA ENKELBRUNNS SCREENING AV ANTIKROPPAR MOT EXTRAHERBARA NUKLEÄRA ANTIGENER

För diagnostisk användning in vitro

För yrkesmässigt bruk

Katalognummer: 7096-10 (96 brunnarna) och 7696-10 (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 denna 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-antigenen 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-patienterna 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 mot 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 höga antikroppnivåer 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 patienter med SLE (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 analoga, 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 patienterna 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 maximalt 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-antigen 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, framför allt den delmängd patienter 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 patienterna med polymyosit eller dermatomyosit, men inte vid andra myopati (11, 32). Anti-Jo1-antikroppar har också visat sig vara högt associerade med interstitiell lungsjukdom i samband med myosit (32).

TESTPRINCIP

Detta test är en kvalitativ indirekt EIA. Mikrobrunnarna har belagts med en blandning av stabiliserade affinitetsrenade extraherbara nukleära antigener som fungerar som antigensubstrat i detta system. Utspädda patientprover 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 som är 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 konjugat av pepparrotperoxid bildas ett stabilt komplex i 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 upptäcks detta komplex genom att tillsättning av en lösning av tetrametylbensidin (TMB) och H_2O_2 som kromogent substrat. Graden av färgutveckling i varje brunn står i relation till koncentrationen av anti-ENA-antikroppar i respektive serumprov. Varje mikrobrunn avläses med hjälp av en 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

Extraherbar atomära antigener kodade mikrotit brunns strips: Katalognummer 7008-10. En mikrotit brunns ram innehållande tolv åtta brunn strips kodade med en blandning av sju stabiliserade affinitet renad extraherbar atomära antigener (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Scl.70, och Jo-1). Dessa strips är brunt färg-kodade. Om färre än åtta brunns behövs för testet kan brunns separeras genom att knäppa dem itu. De oanvända stripsen kan förvaras i foliepåsen i kyla upp till 45 dagar.

Provspädningsvätska: Katalognummer 7100 (100 ml). Patentskyddad buffrad provspädningsvätska som används för spädning av patientprover.

Enzymantikroppreagens - human IgG tung- och lättkedjespecifik: Katalognummer 7009-10 (14 ml). Getantihuman IgG (H och L) konjugerad med pepparrotperoxid (HRP). Reagensen är bruksfärdig.

Substratlösning: Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning som innehåller stabiliserad 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H_2O_2). 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.

ENA kalibratorserum: Katalognummer 7026-10 (2 ml). Humanserum innehållande antikroppar mot en eller fler av de extraherbara nukleära antigenerna Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och/eller Jo-1. Analysvärdet för detta serum står angivet på ampul etiketten. Detta serum är färdigspätt och kan användas direkt.

ENA positiv kontroll: Katalognummer 7021-10 (2 ml). Humant positivt kontrollserum innehållande antikroppar mot en eller flera av de extraherbara nukleära antigenerna Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och/eller Jo-1. Detta serum är färdigspätt och bruksfärdigt.

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.

Tillhörande ENA utspädd och analyserad positiv kontroll: Katalognummer 7022-10 (0,25 ml). Humant positivt kontrollserum innehållande antikroppar mot en eller flera av de extraherbara nukleära antigenerna Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och/eller Jo-1. Behandla denna positiva kontroll som utspätt serum. Analysvärdet för detta serum anges på ampul etiketten.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

Hållare för mikrofordjupningsremsor

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
Läskapper eller pappershanddukar
Multikanalspipett som kan pipettera maximalt 8 brunnar
Engångshandskar
Laboratorietidur

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts i den här produkten har testats med FDA-godkända metoder och visat 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 yantigen (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.
2. Alla kontrollsera, kalibratorsera och patientprov 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*.
3. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel i kontrollen och kalibratorserat. 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.
4. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
5. Värm inte upp inaktiva serumprov som skall användas för RELISA[®] ENA filtertestning. Värmeinaktivering kan ge förhöjda värden.

6. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
7. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prover med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.
8. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prov eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
11. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat. Proverna måste hållas instängda i mikrobrunnarna under hela analysen.
12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
13. Placera alla reagenser, mikrofordjupningar och prov i rumstemperatur (18-24°C) före användning.
14. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
15. Mikrobiell kontamination av reagenser eller prov kan ge felaktiga resultat.
16. 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.

VARNING: *Värm inte upp inaktiva serumprover som skall användas för RELISA® ENA screentester. Värmeinaktivering kan ge förhöjda värden.*

Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom dessa förhållanden 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 fryslagerrum.

VARNING: 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 inexakta 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. Vid framställning av provspädningar skall pipettspetsarna torkas av innan serum dispensereras i provspädningen. 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 resterande tvättbuffert. Användning av det automatiserade tvättsystemet för mikrobrunnar ger konsekvent tvätt av brunnarna, varför detta rekommenderas.

OBSERVERA: Då det finns många olika tvätteknycktyper och automatiserade program kan antalet tvättar behöva justeras för optimala resultat. Varje laboratorium bör fastställa det mest effektiva antalet tvättar för sitt tvättsystem.

- Om den resterande tvättbufferten inte avlägsnas ordentligt kan detta leda till ojämn färgutveckling. Mikrobrunnnsremorna skall läskas mot absorberande papper eller handdukar för att minimera mängden kvarvarande tvättbuffert.
- Det är av yttersta vikt att alla steg utförs i rätt tid. Alla serumprover skall spädas innan proceduren påbörjas och de måste dispensereras till mikrobrunnarna på så kort tid som möjligt (inte mer än fem minuter). Batchstorlekarna skall väljas så att provhanteringen går så smidigt som möjligt under denna tidsperiod. Prov- och reagenshanteringen underlättas med hjälp av en multikanalspipett, varför detta rekommenderas.
- Med undantag för den sista inkubationen (substratlösning) börjar varje inkubationstid med att prover 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

BERÄKNINGAR

- Subtrahera absorptionsvärdet för reagensämnesbrunnen från de absorptionsvärden som erhållits i kalibrator-, kontroll- och patientprovbrunnarna. Beräkna de genomsnittliga absorptionsvärdena för dubbla brunnar.
- Dela den specifika antikroppkoncentrationen i kalibratorserat (står angivet på etiketten) med medelabsorptionsvärdet för kalibratorbrunnarna för att få fram konverteringsfaktorn.
- Multiplisera absorptionsvärdena för vart och ett av proven med denna konverteringsfaktor för att erhålla den specifika antikroppkoncentrationen i enheter.
- Den förenklade formeln för dessa beräkningar kan uttryckas på följande sätt:

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

U_c = Kalibratorvärde (enheter)

λ_c = Kalibratorabsorption*

λ_s = Provabsorption*

U_s = Provets enhetsvärde

*Använd duplikatbrunnarnas medelabsorption, om kalibratorer och prover körs i duplikat.

KVALITETSKONTROLL

- Kalibratorbrunnarnas genomsnittliga absorptionsvärde måste vara minst 0,400. Absorptionsvärden som är lägre än 0,400 innebär att färgutvecklingen är otillräcklig och serien 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 särskilt beaktande av valet av tidpunkt för alla steg.
- Den färglösa kontrollbrunnen skall ha ett absorptionsvärde på mindre än 0,150. Färglösa absorptionsvärden större än 0,150 tyder på otillräcklig tvättning eller kontamination av reagenser.
- Prover med specifika antikroppvärden som är större än den övre gränsen av kalibratoren borde visas positiva med ett enhetsvärde "större eller lika med" enhetsvärdet som visas på etiketten på kalibrator serumet.
- Konverteringsfaktorn måste beräknas för varje serie. Resultaten blir ogiltiga om en konverteringsfaktor från en annan serie används.
- Varje laboratorium bör upprätta och underhålla sina egna referensintervall (normalvärden) baserat på patientpopulation och andra lokala faktorer.
- Det positiva kontrollserat är ett humanserum som innehåller antikroppar mot en eller flera av de extraherbara nukleära antigenerna Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och/eller Jo-1. Detta är en kvalitativ kontroll som bör ge ett värde som är större än 20 ENA-enheter.
- Det negativa kontrollserumet är en samling humanserum som inte innehåller antikroppar mot någon av de sex autoantigenerna i detta test. Detta är en kvalitativ kontroll som bör ge värden på mindre än 20 ENA-enheter.
- Det ospädda och analyserade positiva kontrollhumanserumet är ett humanserum som innehåller antikroppar mot en eller flera av de extraherbara nukleära antigenerna Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 och/eller Jo-1. Analysvärdet för denna kontroll anges på etiketten. Detta intervall upprättades för att omfatta 99 procent av förväntade värden på grund av statistisk normal variation. Ibland kan små avvikelser förväntas uppstå utanför dessa områden. Varje laboratorium bör upprätta sina egna kriterier för acceptabla respektive ej acceptabla intervall grundade på hur förtrogna de är med denna analys.
- Om något kontrollvärde ligger utanför området är analysen ogiltig och måste göras om.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

1. Detta är en kvalitativ analys. Nivåerna av detekterade antikroppar har ingen känd klinisk betydelse, och de enhetsvärden som erhållits i denna analys har endast beräknats för att dela in patienter i följande tre breda grupper. Patientprovbrunnar som har beräknade värden större än eller lika med 25 ENA-enheter betraktas som positiva och skall analyseras med avseende på individuella ENA-specificiteter. Patientprovbrunnar som har beräknade värden som är mindre än 20 ENA-enheter betraktas som negativa. Värden mellan 20 och 25 enheter betraktas ligga på gränsen till att vara positiva och skall göras om, eller analyseras med avseende på individuella ENA-specificiteter. Varje laboratorium måste fastställa sina egna referensområden och 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. Eftersom RELISA® ENA enkelbrunn screeningtestet består av en blandning av antigener, består resultaten av en sammansättning antikroppreaktioner mot var och en av de sex antigenerna. Om flera autoantikroppar har låga nivåer, kan RELISA® ENA enkelbrunn screeningtestet uppvisa ett positivt resultat, medan enskilda specificiteter kan ligga under respektive frånslagsvärden.

RAPPORTERING AV RESULTATET

Resultatet skall rapporteras som positivt eller negativt för antikroppar mot extraherbara nukleära antigener. Antikroppnivåerna har ingen känd klinisk signifikans.

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 laboratorieupptäckter 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 litet eller inget 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 indikerar inte nödvändigtvis sjukdomens svårighetsgrad eller varaktighet.

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 sammanfattas 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%
Sci-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 analys av sera från 403 friska blodgivare, 205 kvinnor och 198 män, av vilka ingen veterligt hade haft någon reumatisk sjukdom tidigare. Baserat på dessa data upprättades de normala frånslagsvärdena som mindre än 20 ENA-enheter. God laboratoriepraxis föreskriver att varje laboratorium måste upprätta sina egna normala spridningsområden baserade på patientpopulation och andra lokala faktorer.

PRESTANDA

Immuno Concepts RELISA® enkelbrunns ENA screeningtest jämfördes med Immuno Concepts RELISA® multiparameter ENA screeningtest. Den patientpopulation som studerades bestod av 50 patienter som motsvarade kriterierna för diagnosen systemisk lupus erytematosus, 25 patienter med autoimmun myosit eller myositöverlappande syndrom, 23 patienter med diagnosen skleroderma eller progressiv systemisk skleros, 21 patienter med Sjögrens syndrom, 3 patienter med diagnosen reumatoid artrit, 18 patienter med odifferentierad bindvävssjukdom och 403 personer utan känd autoimmun sjukdom. Följande data erhöles vid denna jämförelse. Tabell 2.

Tabell 2	Positivt	Gränsfall	Negativt
Immuno Concepts RELISA® Enkelbrunn ENA Screeningtest	126	9	5
	0	2	4
	1	2	394

Gränsfallresultaten betraktades som positiva. Dessa data gav följande statistik: relativ sensitivitet 97,9%, relativ specificitet 97,8% och total överensstämmelse 97,8%.

REPRODUCERBARHET









Sex positiva prover och fem negativa kördes vid tre olika tillfällen på antigenremсор med tre olika lotnummer. Inte i något fall gav ett negativt prov positiva resultat. De positiva proverna gav genomgående positiva resultat.

BIBLIOGRAFI

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-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 (Kinetochore) 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). *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., 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.
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) 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) 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., Szosteck, 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.

	Fabrikant		Auktoriserad Representant europeiska unionen
	Temperatur begränsning		Innehåller tillräckligt för <n> test
	Se instruktionerna		In vitro diagnostiska medicinapparater
	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

Cat 7096-10-I, 4.11.02.003.101-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 ENKELBRUNNS SCREENING TESTPROCEDUR

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 var proverna skall stå i mikrobrunnarna. Analysera kalibratorm två gånger. En brunn används för ett reagensämne. Vi rekommenderar att varje kontroll- och patientprov analyseras två gånger tills godtagbar precision för laboratorieprovet har upprättats.

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 PATIENTPROVER

Späd patientprov till 1:40 genom tillsättande av 25 µl serum till 975 µl provspädningsvätska. Om den tillhörande ENA-outspädda och analyserade positiva kontrollen används, skall denna spädas på samma sätt som patientproven. Blanda väl. Kalibratorm, den positiva kontrollen och den negativa kontrollen levereras färdigspädda och kräver ingen ytterligare spädning.

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. Vid bruk av individuella brunnar eller mindre än en hel strip med brunnar bör du vara säker på att varje brunn sitter riktigt på plats. Brunnar som är ordentligt på plats i ramhållaren trillar inte ut när ramhållaren är omvänd. Om mindre än 8 brunnar behövs för testet kan brunnen delas genom att knäppa dem itu. Oanvända brunnar kan förvaras i foliepåsen förseglad och kylt i upp till 45 dagar.

5. DISPENSERING AV SPÄDNINGAR

Dispensera 100 µl av kalibratorerna, kontrollerna och de spädda patientproverna i lämpliga brunnar (se arbetsblad). Dispensera 100 µl provspädningsvätska i reagensämnesbrunnen.

6. ODLING AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)

Odla 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. TVÄTT AV REMSORNA (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 ENZYMTIKROPPREAGENS

Dispensera 100 µl enzymantikroppreagens i varje brunn.

9. ODLING AV REMSOR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)

Odla i rumstemperatur under trettio 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 med 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 till mycket svagt blå.

12. ODLA REMSORNA (exakt 30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)

Odla i rumstemperatur under exakt 30 minuter. Remsorna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden.

13. DISPENSERING AV STOPPREAGENS

När den första brunnen har inkuberats 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. AVLÄSNING AV BRUNNARNAS ABSORPTION

Brunnarna måste avläsas i en plattläsande spektrofotometer inom 30 minuter efter tillsättandet av stoppreagensen. Brunnarna avläses vid 450 nm mot den färglösa kontrollbrunnen. Om spektrofotometer med dubbla våglängder används skall referensfiltrets våglängd ställas in på 600-650 nm. Avläsning av mikrobrunnarna utan referensfilter ger högre absorptionsvärden.

TEKNISK SUPPORT: +1-916- 363-2649

eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

