

VERWENDUNGSZWECK

Das ZEUS-ELISA-ANA-Screen-Testsystem ist ein qualitativer Screeningassay zum Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) in Humanserum. Bei bestimmungsgemäßer Durchführung weist der Test alle routinemäßig getesteten ANA wie z. B. Antikörper gegen doppelsträngige DNA (dsDNA), Jo-1, Sm, Sm/RNP, SS-A, SS-B und Scl-70 nach. Weiterhin weist der Test ANA nach, die zentromerische, nukleoläre, periphere oder spindelindirekte Immunfluoreszenz-Antikörper (IFA)-Muster aufweisen. Dieser Test ist zur in-vitro-Diagnostik vorgesehen.

HINTERGRUND

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Autoantikörper gegen eine Anzahl von Zellkernbestandteilen zur Diagnose verschiedener Bindegewebserkrankungen herangezogen werden können. Antikörper gegen dsDNA sind hochspezifisch für systemischen Lupus erythematosus (SLE) und korrelieren eng mit dem Beginn der Lupusnephritis. Jo-1-Autoantikörper gehören zu einer Reihe charakteristischer Autoantikörper, die spezifisch bei Myositis-Patienten beobachtet werden¹⁹ und für die hohe Häufigkeit der begleitenden interstitiellen Lungenerkrankungen verantwortlich sind.¹⁰ Ärzten zufolge sind Antikörper gegen den Sm-Marker hochspezifisch für Patienten mit SLE und gelten als ein diagnostisches Kriterium für SLE.^{1,2} Hohe Konzentrationen von RNP-Antikörpern alleine deuten auf eine Mischkollagenose hin und werden in der Regel mit einem gutartigen Krankheitsverlauf assoziiert,³ während niedrige Konzentrationen von RNP-Antikörpern zusammen mit anderen Autoantikörpern im Serum von Patienten mit progressiver systemischer Sklerose, Sjögren-Syndrom und rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden können. Das Auftreten von RNP-Antikörpern im Serum von SLE-Patienten wird in der Regel mit einer geringeren Inzidenz der Nierenbeteiligung und einem gutartigen Krankheitsverlauf assoziiert. Dagegen sind Patienten mit Sm-Antikörpern häufiger von Nieren- und ZNS-Komplikationen betroffen.⁴ Autoantikörper gegen SS-A und SS-B sind ggf. bei Patienten mit SLE^{5,6} und Sjögren-Syndrom^{7–9} nachzuweisen.^{7–9} SS-A-Antikörper finden sich häufig im Serum von ANA-negativen SLE-Patienten mit subakutem kutanen Lupus erythematosus,¹² einem lupusähnlichen Syndrom bei homozygotem C2-Mangel¹³ sowie bei einer Untergruppe von Patienten, die keine Anti-dsDNA-Antikörper¹¹ besitzen. Scl-70-Antikörper sind hochspezifisch für Sklerodermie.¹¹ In Forschungsstudien wurden diese Antikörper vereinzelt auch bei SLE-Patienten nachgewiesen. Scl-70-positive Sklerodermie-Patienten leiden in der Regel an einem schwereren Krankheitsverlauf, größerer Beteiligung innerer Organe und diffuser, anstelle begrenzter Hautbeteiligung.¹⁴ Scl-70-Antikörper kommen selten bei anderen Autoimmunerkrankungen vor. Daher ist ihr Nachweis bei einem Patienten mit kürzlich aufgetretenem Raynaud-Syndrom von großer Bedeutung.¹⁵ Nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht der verschiedenen o. g. Autoantikörper und die damit assoziierten Erkrankungen¹⁶:

Antikörper	Erkrankung	Relative Häufigkeit des Antikörpernachweises (%)
Anti-Jo-1	Myositis	25 - 44 (19)
Anti-Sm	SLE	30*
Anti-RNP	Mischkollagenose, SLE	100** bzw. >40
Anti-SSA (Ro)	SLE, Sjögren-Syndrom	15 bzw. 30–40
Anti-SSB (La)	SLE, Sjögren-Syndrom	15 bzw. 60-70
Anti-Scl-70	Systemische Sklerose	20 - 28*
Anti-dsDNA	SLE	40 - 60*
*Hochspezifisch		
**Hochspezifisch bei alleinigem Vorkommen und hohem Titer		

Bis vor kurzem wurden die Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz, Geldiffusion nach Ouchterlony, Hämagglutination, Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay (ELISA) individuell nachgewiesen. Im Gegensatz zu anderen Testsystemen bietet die ELISA-Technologie eine empfindliche, objektive und rasche Auswertung der Proben und eignet sich daher auch für das Screening hoher Probenaufkommen auf Gesamt-ANA.

Die genaue Ätiologie der Autoimmunerkrankungen ist bisher unbekannt und die spezifische Rolle der Autoantikörper beim Auftreten der verschiedenen Autoimmunkollagenosen ist noch wenig erforscht. Der Krankheitszusammenhang und die Nachweishäufigkeit dieser Antikörper, stellen im ZEUS ELISA ANA Screen Test System eine effiziente Testmethode für die Laborbeurteilung von Patienten mit verschiedenen Bindegewebserkrankungen dar.

PRINZIP DES TESTS

Das ZEUS-ELISA-ANA-Screen-Testsystem dient zum Nachweis von Antikörpern der Klasse(n) IgG zum ANA in humanen Sera. Die Probenfelder auf Kunststoffstreifen wurden durch passive Absorption mit ANA Screen-Antigen erstellt. Das Testverfahren umfasst drei Inkubationsschritte:

1. Die (richtig verdünnten) Testsera werden in Antigen-beschichteten Probenfeldern inkubiert. Antigen-spezifische Antikörper in der Probe binden sich an das immobilisierte Antigen. Die Platte wird gewaschen, um ungebundene Antikörper und andere Serumkomponenten zu entfernen.
2. Mit Peroxidase konjugiertes anti-humanes-IgG wird in die Felder gegeben und die Platte wird inkubiert. Das Konjugat reagiert mit dem IgG-Antikörper, der in Schritt 1 in solider Phase immobilisiert wurde. Die Felder werden gewaschen, um nicht reagiertes Konjugat zu entfernen.
3. Die Probenfelder mit dem immobilisierten Peroxidase-Konjugat werden mit Peroxidase-Substratlösung inkubiert. Die Hydrolyse des Substrats durch Peroxidase bewirkt eine Farbänderung. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion gestoppt und die Farbtintensität der Lösung fotometrisch gemessen. Die Farbtintensität der Lösung hängt von der Antikörperkonzentration in der ursprünglichen Testprobe ab.

KOMPONENTEN DES TESTSYSTEMS

Gelieferte Materialien

Jedes Testsystem enthält die folgenden Komponenten in ausreichenden Mengen, um die auf der Verpackung angegebene Anzahl von Tests durchzuführen. **HINWEIS: Folgende Komponenten enthalten <0,1 % (Gtrmm-Vol.-%) Natriumazid als Konservierungsmittel): Kontrollflüssigkeiten, Kalibrierer und Probenverdünner.**

PLATE	1. Platte: Jede Platte ist für 96 Bestimmungen vorgesehen. (12x1x8 Probenfelder). Die Streifen befinden sich in einem Streifenhalter und sind in Umschlägen mit einem Trockenmittel versiegelt und in Plastikbeuteln verpackt.
CONJ	2. Konjugat: Konjugiertes (Meerrettich-Peroxidase) anti-humanes IgG (Ziege, γ-kettenspezifisch). 15ml-Fläschchen mitweißem Deckel. Gebrauchsfertig.
CONTROL +	3. Positiv-Kontrollflüssigkeit (humanes Serum). Ein (1) 0,35 ml-Fläschchen mit rotem Deckel.
CAL	4. Kalibrierer (humanes Serum). Ein (1) 0,5 ml-Fläschchen mit blauem Deckel.
CONTROL -	5. Negativ-Kontrollflüssigkeit (humanes Serum). Ein (1) 0,35 ml-Fläschchen mit grünem Deckel.
DIL SPE	6. Probenverdünner: Eine (1) 30 ml-Flasche (grünem Deckel) mit Tween-20, bovinem Serumalbumin und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Violette Lösung. Gebrauchsfertig.
SOLN TMB	7. TMB: Eine (1) orange 15 ml-Flasche (oranger Deckel) mit 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.

SOLN	STOP
WASHBUF	10X

8. Stopplösung: Eine (1) 15 ml-Flasche (roter Deckel) mit 1M H₂SO₄, 0,7M HCl. Gebrauchsfertig.

9. (durchsichtiger Deckel) mit einer 10fach-konzentrierten Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung und Tween-20 Lösung (blaue Lösung). **HINWEIS: Die 1X-Lösung hat einen pH von 7,2 ± 0,2.**

HINWEISE:

- Die folgenden Komponenten sind nicht Testsystem-Chargennummer-abhängig und können bei jedem ZEUS-ELISA-Test eingesetzt werden: TMB, Stopplösung und Waschpuffer.
- Das Testsystem enthält außerdem Komponentendatenetikett mit chargenspezifischer Information in der Testsystem-Box

VORSICHTSMASSNAHMEN

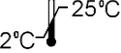
- Nur zum Gebrauch in *In-vitro*-Diagnosen.
- Bei der Handhabung von Laborreagenzien normale Vorsichtsmassnahmen einhalten. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Angemessene Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Dämpfe nicht einatmen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen und nationalen Gesetze befolgen.
- Die Felder auf der ELISA-Platte enthalten keine lebensfähigen Organismen. Dennoch sollten die Streifen als **potenzielle biologische Gefahrenstoffe** eingestuft und entsprechend behandelt werden.
- Die Kontrollflüssigkeiten sind **potenzielle biologische Gefahrenstoffe**. Die Quellenmaterialien dieser Produkte wurden mit anerkannten Testmethoden negativ auf HIV-1-Antigen, HBsAg. und auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet. Keine Testmethode kann jedoch eine komplette Gewähr dafür liefern, dass keine infektiösen Agenten vorhanden sind, und deshalb sind diese Produkte gemäß Biosicherheitsstufe 2 zu behandeln, wie für alle potenziell infektiösen humanen Serum- oder Blutproben in der aktuellen Ausgabe des Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ der Centers for Disease Control/National Institutes of Health und „Standard for Bloodborne Pathogens“²⁰ von OSHA empfohlen.
- Einhalten der angegebenen Inkubationszeit und Temperatur ist entscheidend für akkurate Resultate. **Alle Reagenzien müssen vor dem Test Zimmertemperatur (20–25 °C) annehmen.** Nicht verbrauchte Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf Kühlschranktemperatur bringen.
- Falsches Waschen kann falsche positive bzw. negative Resultate erzeugen. Sicherstellen, dass Waschmittelreste auf ein Minimum reduziert werden (z.B. durch Trocknen mit Papier oder Aspiration), bevor Konjugat oder Substrat zugefügt wird. Die Felder zwischen Inkubationen nicht austrocknen lassen.
- Das Probenverdünnungsmittel, die Kontrollen, und Kalibrierer enthalten <0,1 % (Gramm-Vol.-%) Natriumazid. Natriumazid bildet Blei- und Kupferazide in Laborabflussrohren, die bei Rohrleitungsschlägen Explosionen verursachen können. Waschbecken nach dem Ausgießen von Natriumazid-haltigen Lösungen gründlich ausspülen, um Explosionen zu verhindern.
- Die Stopplösung ist bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken GIFTIG und kann Verbrennungen verursachen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort ärztlichen Rat einholen.
- Die TMB-Lösung ist SCHÄDLICH. Sie ist ein Irritans für Augen, Atmungssystem und Haut.
- Das Waschpufferkonzentrat ist ein IRRITANS für Augen, Atmungssystem und Haut.
- Die Unterseite der Platte von Flüssigkeitsrückständen und/oder Fingerabdrücken, die die optische Dichteablesung (OD) stören könnten, sauber wischen.
- Verdünnung oder Verpanschung der Reagenzien kann falsche Resultate erzeugen.
- Keine Reagenzien aus anderen Quellen oder von anderen Herstellern verwenden.
- Die TMB-Lösung sollte bei der Anwendung farblos, sehr hell gelb, sehr hell grün oder sehr hell blau sein. Ein Kontamination der TMB mit Konjugat oder anderen Oxidanzien führt zu einer vorzeitigen Farbänderung der Lösung. Die TMB-Lösung nicht verwenden, wenn sie merklich blau ist.
- Niemals mit dem Mund pipettieren. Kontakt von Reagenzien und Patientenproben mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden. Inkorrekte Resultate sind möglich.
- Querkontamination von Reagenzien und/oder Proben kann fehlerhafte Ergebnisse erzeugen
- Wiederverwendbare Glasbehälter müssen gewaschen und gründlich von allen Detergenzien frei gespült werden.
- Spritzen oder Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
- Reagenzien in der Aufbewahrung oder bei der Inkubation keinem starken Licht aussetzen.
- Die Probenfelderstreifen und den Halter auf Zimmertemperatur kommen lassen, bevor der Schutzumschlag geöffnet wird, um die Felder vor Kondensation zu schützen.
- Die Waschlösung in einem Entsorgungsbassin sammeln. Die verbrauchte Lösung mit einem Desinfizierer (z. B. 10-prozentiger Haushaltsbleiche - 0,5 % Natriumhypochlorit) behandeln. Reagenzien keinen Bleichdämpfen aussetzen.
- Vorsicht: Flüssigkeitsabfälle mit saurem pH vor Zufügen in die Bleichlösung neutralisieren.
- Die ELISA Platte nicht verwenden, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel nicht blau, sondern rosa ist.
- Konjugat nicht mit Behältern oder Instrumenten in Kontakt kommen lassen, die vorher eine Lösung mit Natriumazid als Konservierungsmittel enthalten haben könnten. Rückstände von Natriumazid können die Enzymaktivität des Konjugats unterbinden.
- Die reaktiven Reagenzien keinen Lösungen mit Bleichmittel oder starken Gerüchen von Lösungen mit Bleichmittel aussetzen. Spuren von Bleichmittel (Natriumhypochlorit) können die biologische Aktivität vieler reaktiver Reagenzien in diesem Testsystem unterbinden.

BENÖTIGTE ABER NICHT DELIEFERTE MATERIALIEN

- ELISA-Probenfeldleser mit Lesefähigkeit für eine Wellenlänge von 450 nm. **HINWEIS: Es kann ein Lesegerät für eine (450 nm) oder zwei Wellenlängen (450/620–650 nm) verwendet werden. Zwei Wellenlängen werden bevorzugt, da der zusätzliche Referenzfilter potenzielle Interferenzen aufgrund von anomaler Lichtabsorption verringert.**
- Pipetten mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 10 bis 200 µl.
- Multikanal-Pipette mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 50 bis 200 µl.
- Reagenzreservoirs für Multikanal-Pipetten.
- Waschflasche oder Probenfeld-Waschsystem.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Messzylinder, 1 Liter.
- Serologische Pipetten.
- Einweg-Pipettenspitzen.
- Papierhandtücher.
- Labor-Stoppuhr zur Überwachung der Inkubationsschritte.
- Entsorgungsbassin und Desinfizierer (z. B. 10-prozentiger Haushaltsbleiche - 0,5 % Natriumhypochlorit).

AUFBEWAHRUNG

	Beschichtete Probenfeldstreifen: Übrige Streifen sofort wieder mit Trockenmittel versiegeln und zur korrekten Aufbewahrung zurückbringen. Nach Öffnen des Umschlags sind die Streifen bis 60 Tage stabil, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel blau bleibt.
	Ungeöffnetes Testsystem, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit und Negativ-Kontrollflüssigkeit, TMB, Probenverdünner

 25°C	Stopplösung: 2 - 25°C Waschpuffer (1X) : 20 - 25°C bis zu 7 Tage, 30 Tage zwischen 2 - 8°C. Waschpuffer (10X) : 2 - 25°C
--	--

PROBENAHMEN

- Es wird von ZEUS Scientific empfohlen, dass die Probenahme durch den Benutzer in Übereinstimmung mit dem aktuellen NCCLS-Dokument M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease erfolgt.
- Keine Testmethode kann eine komplette Gewähr dafür liefern, dass humane Blutproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate als potenziell infektiös behandelt werden.
- Für diesen Test nur frisch entnommene und richtig gekühlte Sera verwenden, die mit zugelassenen aseptischen Venenpunkturnverfahren gewonnen wurden^{17, 18}. Nicht verwenden, wenn Antikoagulanzen oder Konservierungsmittel zugefügt sind. Hämolytierte, lipemische oder bakteriell kontaminierte Sera vermeiden.
- Proben nicht länger als 8 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahren. Erfolgt der Test nicht innerhalb von 8 Stunden, können Sera zwischen 2 °C und 8°C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. Wird eine noch längere Testverzögerung vorausgesehen, Testsera bei -20 °C oder darunter aufbewahren. Nicht mehrmals einfrieren/auftauen, weil dies zu einem Verlust der Antikörperaktivität und damit fehlerhaften Resultaten führen könnte. Es ist die Verantwortung der einzelnen Labors, alle verfügbare Literatur und/oder eigenen Studien zu Bestimmung der Stabilitätskriterien für das eigene Labor zu verwenden (21).

ASSAY-VERFAHREN

- Die verschiedenen Komponenten aus der Aufbewahrung holen und auf Zimmertemperatur (20–25 °C) erwärmen lassen.
- Die benötigte Anzahl Probenfelder feststellen. Sechs Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Festlegungen pro Test (eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit, drei Kalibrierer und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit) einplanen. Bei jedem Test eine Leerwertprobe testen. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Konfiguration prüfen. Nicht verwendete Streifen in den wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel legen, versiegeln und zur Aufbewahrung zwischen 2 °C und 8 °C zurückbringen.

BEISPIEL PLATTENEINSTELLUNG		
	1	2
A	Leerwertprobe	Patient 3
B	Negativ-Kontrollflüssigkeit	Patient 4
C	Kalibrierer	usw.
D	Kalibrierer	
E	Kalibrierer	
F	Positiv-Kontrollflüssigkeit	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

- Eine 1:21 Verdünnung (z.B. 10 µl Serum + 200 µl Probenverdünner) von Negativ-Kontrollflüssigkeit, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit und jedem Patientenserum herstellen. **HINWEIS: Zur Bestätigung der Mischung der Probe mit dem Verdünnungsmittel ändert das Probenverdünnungsmittel seine Farbe.**
- Je 100 µL der verdünnten Kontrollflüssigkeiten, Kalibrierer und Patientenproben in Felder geben. Proben gut durchmischen. Für jede Probe einen neuen Pipettenspitze verwenden.
- 100 µl Probenverdünner als Leerwertprobe in Feld A1 geben. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Felderkonfiguration für die Leerwertprobe prüfen.
- Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 60 ± 65 Minuten lang inkubieren.
- Die Probenfelderstreifen 5 Mal waschen.
 - Waschen von Hand:**
 - Die Flüssigkeit kräftig aus den Feldern ausschütteln.
 - Jedes Probenfeld mit Waschpuffer füllen. Sicherstellen, dass die Felder keine Luftbläschen enthalten.
 - Schritte 1. und 2. für insgesamt 5 Wäschen wiederholen.
 - Die Waschlösung aus den Feldern ausschütteln. Die Platte auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen. Die Platte visuell auf evtl. verbleibende Waschlösung inspizieren. Waschlösung in einem Einweg-Bassin sammeln und am Ende der täglichen Tests mit Desinfizierer behandeln.
 - Automatisches Waschen:**
Bei Verwendung einer automatischen Probenfeld-Waschvorrichtung das Abgabevolumen auf 300–350 µl/Feld einstellen. Den Waschzyklus auf 5 Wäschen ohne Pause zwischen den Wäschen stellen. Falls nötig, die Probenfelderplatte aus dem Wäscher entnehmen, auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen.
- 100 µl Konjugat mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
- Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 30 ± 35 Minuten lang inkubieren.
- Probenfelder wie in Schritt 7 beschrieben waschen.
- 100 µl TM-Lösung mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
- Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 30 ± 35 Minuten lang inkubieren.
- Reaktion durch Zufügen von 50 µl Stopplösung mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei TMB in jedes Feld stoppen, einschließlich in dem Feld mit Leerwertprobe. Positive Proben ändern ihre Farbe von blau zu gelb. Nach Zufügen der Stopplösung mehrmals an die Platte klopfen, um sicherzustellen, dass sich die Proben gut durchmischen.
- Den Probenfeldleser auf eine Wellenlänge von 450 nm stellen und die optische Dichte (OD) jedes Feldes gegen die Leerwertprobe messen. Die Platte innerhalb von 30 Minuten nach Zufügen der Stopplösung lesen.

TESTVERFAHREN IN KURZFORM

- Serum 1:21 verdünnen.
- Verdünntes Serum in Probenfelder geben - 100µL/Feld
- 60 bis 65 Minuten inkubieren.
- Waschen.
- Konjugat zufügen - 100µL/Feld.
- 30 bis 35 Minuten inkubieren.
- Waschen.
- TMB zufügen - 100µL/Feld.
- 30 bis 35 Minuten inkubieren.
- Stopplösung zufügen - 50µL/Feld
- Innerhalb von 30 Minuten ABLESEN.

QUALITY CONTROL

- Bei jeder Prozedur muss der Kalibrierer dreifach angewendet werden. Eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit sind ebenfalls einzubeziehen.

- Den Mittelwert der drei Kalibrierfelder berechnen. Weicht einer dieser drei Werte um mehr als 15 % vom Mittelwert ab, diesen Wert verwerfen und den Mittelwert der anderen beiden Felder berechnen.
- Der OD-Mittelwert für den Kalibrierer, für die Positiv- und Negativ-Kontrollflüssigkeiten sollten in die folgenden Bereiche fallen:

	<u>OD-Bereiche</u>
Negativ-Kontrollflüssigkeit	≤0,250
Kalibrierer	≥0,300
Positiv-Kontrollflüssigkeit	≥0,500

 - Die OD der Negativ-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere OD des Kalibrierers sollte ≤ 0,9 ergeben.
 - Die OD der Positiv-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere OD des Kalibrierers sollte ≥ 1,25 ergeben.
 - Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, muss der Test als ungültig gelten und wiederholt werden.
- Die Positiv-Kontrollflüssigkeit und Negativ-Kontrollflüssigkeit dienen nur zur Überwachung eines erheblichen Reagenzversagens und garantieren keine Präzision am Test-Grenzwert.
- Zusätzliche Kontrollflüssigkeiten können in Übereinstimmung mit Richtlinien oder Vorschriften von örtlichen oder staatlichen Stellen oder anerkannten Organisationen verwendet werden.
- Siehe NCCLS Dokument C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurements Procedures für Hinweise zu sachgemäßen Maßnahmen zur Qualitätssicherung.

INTERPRETATION DER RESULTATE

1. Berechnungen:

- Korrekturfaktor:** Ein Grenzwert für den OD-Wert von positiven Proben wurde vom Hersteller festgelegt und mit dem Kalibrierer korreliert. Der Korrekturfaktor (CF) ermöglicht die Festlegung des Grenzwerts für positive Proben unter Berücksichtigung von leichten Abweichungen der Testresultate von Tag zu Tag. Der Korrekturfaktor wird für jede Charge von Komponenten festgelegt und ist auf das Datenetikett in der Testsystem-Box aufgedruckt.
- OD-Grenzwert:** Um den OD-Grenzwert zu erhalten, den CF mit dem oben berechneten mittleren OD-Wert des Kalibrierers multiplizieren.
($CF \times OD\text{-Mittel Kalibrierer} = OD\text{-Grenzwert}$)
- Indexwerte oder OD-Raten:** Den Indexwert bzw. die OD-Rate für jede Probe durch Teilung ihres OD-Werts durch den OD-Grenzwert aus Schritt b berechnen.

Beispiel	OD-Mittel Kalibrierer	=	0,793
	Korrekturfaktor (CF)	=	0,25
	OD-Grenzwert	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	Unbekannte Proben-OD	=	0,432
	Indexwert oder OD-Rate	=	$0,432/0,198 = 2,18$

2. Interpretation: Indexwerte bzw. OD-Raten werden wie folgt interpretiert:

	<u>Indexwerte oder OD-Raten</u>
Negative Proben	≤0,90
Unbestimmte Proben	0,91 – 1,09
Positive Proben	≥1,10

- Eine OD-Ratio von ≤ 0,90 bedeutet, dass keine nachweisbaren IgM-Antikörper zum ANA vorhanden sind.
- Eine OD-Ratio von ≥ 1,10 bedeutet, dass IgM-Antikörper zum ANA nachgewiesen wurden.
- Proben mit Ratio-Werten im fragwürdigen Bereich (0,91–1,09) sollten erneut in doppelter Ausführung getestet werden. Das am häufigsten auftretende Ergebnis (zwei von drei) sollte ausgegeben werden. Proben, die wiederholt grenzwertig sind, sollten anhand einer alternativen Methode wie einem IFA getestet werden oder anhand einer weiteren Probennahme 2-3 Wochen später erneut evaluiert werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

- Das ZEUS ELISA ANA Screen Test System ist ein diagnostisches Hilfsmittel. Die Testergebnisse müssen im Zusammenhang mit der klinischen Beurteilung und den Ergebnissen von anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.
- Positive ANA-Tests können auch bei offenbar gesunden Personen auftreten. Die Ergebnisse sind daher grundsätzlich durch erfahrenes medizinisches Personal unter Berücksichtigung des klinischen Gesamtbildes des Patienten auszuwerten.
- SLE-Patienten unter Steroid-Therapie können negative Ergebnisse aufweisen.
- Eine Vielzahl gebräuchlicher Medikamente kann zu einer ANA-Induzierung führen.
- Das ZEUS-ELISA-ANA-Screen-Testsystem identifiziert nicht, um welchen spezifischen Typ von ANA es sich in einer positiven Probe handelt. Positive Proben sollten anhand spezieller Reflextest wie das ZEUS-ELISA-ANA-Profil-6-Testsystem in Verbindung mit dem ZEUS-ELISA-dsDNA-Testsystem auf individuelle Antikörper untersucht werden. Alternativ können spezifische Antikörper anhand verschiedener Methoden, einschließlich Immunodiffusion, Westernblot-Methode oder mithilfe eines gebündelten, fluoreszierenden, Bead-basierten Systems wie das ZEUS-AtheNA-Multi-Lyte®-ANAI-Plus-Testsystem, nachgewiesen werden.

REFERENZWERTE

Der erwartete Wert für einen gesunden Patienten ist ein negatives Ergebnis. Die Anzahl der positiven Proben und die Reaktionsstärke hängen von Parametern wie dem getesteten Populationstyp, erfolgter Behandlung usw. ab. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwerte anhand typischer Proben aufstellen. Hinsichtlich der Krankheitserscheinung und prozentualen Reaktivität zeigt Tabelle im Abschnitt „Hintergrund“ die relative Häufigkeit der Autoantikörperaktivität bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen.

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

1. Vergleichsstudie

In einer Vergleichsstudie wurden 270 Serumproben parallel mit dem ZEUS-ELISA-ANA-Screen-Testsystem und einem kommerziellen ELISA-System untersucht. Die Spezifität wurde anhand von 72 asymptomatischen normalen Proben aus dem Südosten der Vereinigten Staaten geprüft und die Sensitivität wurde anhand von 198 Proben von Spendern verschiedener Krankheitsstadien aus dem Nordosten der Vereinigten Staaten untersucht. Die Ergebnisse dieser Vergleichsstudie sind in den nachstehenden Tabellen 1-4 zusammengefasst.

Tabelle 1: Spezifitätsprüfung anhand normaler Spenderseren

		Ergebnis im ZEUS ELISA ANA-Screen			
		Positiv	Negativ	Fragwürdig	Gesamt
Kommerzieller ELISA-KIT	Positiv	0	1	1	2
	Negativ	0	59	8	67
	Fragwürdig	0	1	2	3
	Gesamt	0	61	11	72

Tabelle 2: Sensitivitätsprüfung anhand Seren kranker Spender

		Ergebnis im ZEUS ELISA ANA-Screen			Gesamt
		Positiv	Negativ	Fragwürdig	
Kommerzieller ELISA-KIT	Positiv	141	7*	8	156
	Negativ	16*	2	2	20
	Fragwürdig	18	2	2	22
	Gesamt	175	11	12	198

*Steht für diskrepante Proben. Die Berechnungen der relativen Spezifität und Sensitivität sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Diskrepante Proben - Übersicht

Proben-Nr.	Ergebnisse ELISA		Ergebnisse IFA Hep-2*
	ZEUS-ELISA-Test	Sonstige ELISA-Tests	
62	0,902/Fragwürdig	0,87/Negativ	Negativ
64	0,926/Fragwürdig	0,65/Negativ	Negativ
65	0,940/Fragwürdig	0,74/Negativ	Negativ
66	0,950/Fragwürdig	0,53/Negativ	Negativ
68	1,022/Fragwürdig	0,92/Negativ	Negativ
69	1,026/Fragwürdig	0,74/Negativ	Negativ
0	1,045/Fragwürdig	0,43/Negativ	Negativ
71	1,089/Fragwürdig	0,46/Negativ	Negativ
73	0,472/Negative	4,88/Positiv	>/=1:40, gefleckt
74	0,482/Negativ	4,98/Positiv	>/=1:40, gefleckt
76	0,585/Negativ	5,47/Positiv	>/=1:40, gefleckt
77	0,634/Negativ	6,64/Positiv	>/=1:40, gefleckt
79	0,714/Negativ	3,14/Positiv	Negativ
81	0,798/Negativ	2,67/Positiv	>/=1:40, zentromerisch
83	0,876/Negativ	2,68/Positiv	>/=1:40, zentromerisch
84	0,979/Fragwürdig	4,15/Positiv	>/=1:40, gefleckt
85	0,984/Fragwürdig	5,65/Positiv	>/=1:40, gefleckt
87	0,992/Fragwürdig	5,35/Positiv	>/=1:40, zentromerisch
91	1,023/Fragwürdig	3,39/Positiv	≥ 1:320, zentromerisch
92	1,053/Fragwürdig	2,30/Positiv	>/=1:40, gefleckt
93	1,065/Fragwürdig	3,76/Positiv	≥ 1:320, zentromerisch
94	1,073/Fragwürdig	5,08/Positiv	>/=1:40, gefleckt
95	1,091/Fragwürdig	3,23/Positiv	>/=1:40, gefleckt

* ZEUS-IFA-HEp-2 Testsystem

Tabelle 4: Relative Spezifität und Sensitivität

Relative Spezifität:	
1. Berechnung einschließlich fragwürdiger Proben: 59/67 = 88%	2. Berechnung ohne Berücksichtigung fragwürdiger Proben: 59/59 = 100%
Relative Sensitivität:	
1. Berechnung einschließlich fragwürdiger Proben; ohne Klärung diskrepanter Proben: 141/156 = 90.4%	2. Berechnung ohne Berücksichtigung fragwürdiger Proben; nach Klärung diskrepanter Proben: 141/147 = 95.9%
Prozentuale Übereinstimmung: 200/207 = 96.6%	

2. Reproduzierbarkeitsprüfung

Die Reproduzierbarkeitsprüfung wurde auf der Grundlage der Veröffentlichung EP5-T2 Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices – Second Edition des National Committee for Clinical Chemistry Laboratory Standards (NCCLS) durchgeführt. Insgesamt wurden acht Proben getestet: zwei stark positive, zwei mäßig positive, zwei grenzwertige und zwei negative Proben. Jede Probe wurde an jedem Testtag zweimal täglich (vormittags und nachmittags) in doppelter Ausführung getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Reproduzierbarkeitsprüfung

Probe	Mittlere Ratio	Swr ^a	St ^b	Anzahl Testtage	VK %	Gesamtzahl der Tests
1	9,86	0,81	1,28	19	12,95	76
2	11,22	1,25	1,63	20	14,60	80
3	4,20	0,43	0,53	18	12,92	72
4	3,77	0,49	0,56	19	14,96	76
B ₁	1,24	0,07	0,14	20	11,29	80
B ₂	0,94	0,07	0,13	20	14,16	80
5	0,40	0,09	0,14	19	---	76
6	0,20	0,05	0,07	18	---	72

^a Punktschätzung der Standardabweichung bei der Genauigkeit innerhalb des Testlaufs

^b Punktschätzung der Standardabweichung bei der Gesamtgenauigkeit

3. Kreuzreaktivität

Proben, die im HEp-2 IFA-Test negativ für ANA, jedoch positiv für IgG-Antikörper gegen verschiedene Antigene wie EBV-VCA, EBNA, HSV-1, HSV-2, CMV, Rubella und/oder Toxoplasma waren, wurden mit Hilfe des ZEUS-ELISA-ANA-Screen-Testsystems auf potenzielle Kreuzreaktivität getestet. Alle Proben ergaben im ANA-Screen-Kit negative Ergebnisse, was darauf hindeutet, dass die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität mit diesen Antikörpern minimal ist.

LITERATUR

1. Tan E, Cohen A, Fries J, et al: Special Article: The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 25:1271-1277, 1982.
2. Beufels M, Kouki F, Mignon F, et al: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. Am. J. Med. 74:201-215, 1983.
3. Sharp GC, Irwin WS, Tan EM, Holman H: Mixed connective tissue disease. An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am. J. Med. 52: 148-159, 1972.
4. Winfield JB, Brunner CB, Koffler DB: Serological studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. Arthritis Rheum. 21:289-294, 1978.

5. Tan EM, Kunkel HG: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
6. Maddison PJ, Mogavero H, Provost TT, Reichlin M: The clinical significance of autoantibodies to soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* 6:189-192, 1979.
7. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117, 1969.
8. Alexander E, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB: The Ro(SSA) and La(SSB) antibody system and Sjögren's syndrome. *J. Rheum.* 9:239-246, 1982.
9. Alsbaugh MA, Talal N, and Tan E: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
10. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, *et al*: Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Quart. J. Med.* 77:1019-1038, 1990.
11. Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93-151, 1989.
12. Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam JN: Subacute cutaneous lupus erythematosus: A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch. Derm.* 115:1409-1415, 1979.
13. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti Ro (SSA) antibodies. *Arth. Rheum.* In Press.
14. LeRoy EC, Black CM, Fleishmajer R, *et al*: Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:202-205, 1988.
15. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, *et al*: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase 1 antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 34:68-77, 1991.
16. Mongey AB, Hess EV: Antinuclear antibodies and disease specificity. *Advances in Int. Med.* 36 (1): 151-169, 1989.
17. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
18. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for clinical Laboratory Standards.
19. Sturgess A: Review; Recently characterized autoantibodies and their clinical significance. *Aust. N.Z., J. Med.* 22:279-289, 1992.
20. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Fed. Register* 56:64175-64182, 1991.
21. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA und SAve Diluent® sind Markenzeichen von ZEUS Scientific,

Für Kundenservice in den USA kontaktieren Sie bitte Ihren Händler vor Ort.
 Für Technischen Support in den USA kontaktieren Sie ZEUS Scientific durch einen gebührenfreien Anruf oder einer E-Mail an support@zeusscientific.com.
 Für Kundenservice und Technischen Support außerhalb der USA kontaktieren Sie bitte Ihren Händler vor Ort.
 © 2017 ZEUS Scientific, Inc. Alle Rechte vorbehalten.



EMERGO EUROPE
 Prinsessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands