

recomLine ANA/ENA IgG

Immunoassay mit rekombinant produzierten bzw. nativen Antigenen zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen **nukleäre Antigene bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen (Kollagenosen)** in humanem Serum oder Plasma.

1. Allgemeines/ Verwendungszweck

Test zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen charakteristische zytoplasmatische bzw. nukleäre Antigene bei systemischen Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises.

Der Line-Assay dient als Bestätigungstest zur Abgrenzung der autoimmunbedingten rheumatischen Erkrankungen von rheumatischen Krankheiten anderer Ätiologie, aber vergleichbarer Symptomatik.

2. Rheumatische Autoimmunerkrankungen

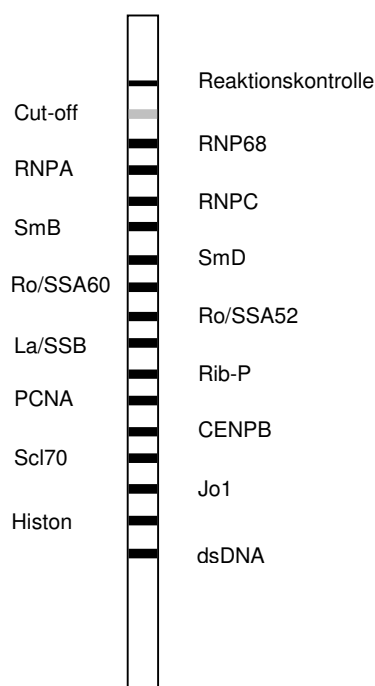
Autoantikörper sind in Serum, Plasma oder teilweise anderen Körperflüssigkeiten nachweisbare Immunglobuline, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Im Fall der Kollagenosen wird u.a. das eigene Bindegewebe angegriffen, was zu Entzündungsreaktionen mit anschließendem Elastizitätsverlust und Gelenkschmerzen führt. Aufgrund der klinischen Symptomatik werden diese Erkrankungen dem rheumatischen Formenkreis zugeordnet. Neben zum Teil noch nicht aufgeklärten pathogenen Faktoren stellen Autoantikörper wichtige serologische Parameter dar, deren pathogenetische Bedeutung bislang unklar ist, die aber differentialdiagnostisch außerordentlich relevant sind

Zu den Kollagenosen zählen folgende Erkrankungen:

- Systemischer Lupus erythematodes (SLE)
- Sjögren Syndrom (SjS)
- Mischkollagenosen; mixed connective tissue disease (MCTD)
- Progressive systemische Sklerodermie (PSS)
- Myositis

3. Diagnostik

Rekombinante Proteine, natives Histon, humane dsDNA und eine Mischung aus rekombinant und synthetisch hergestelltem SmD sind nach folgendem Schema auf einen Nitrozellulose-Streifen aufgebracht:



Für den vorliegenden Test werden 13 gentechnologisch erzeugte Antigene verwendet:

RNP68	spezifisches <u>R</u> ibon <u>u</u> kleop <u>ro</u> tein (68 kDa) als Bestandteil bestimmter Spleißosomen
RNPA	spezifisches <u>R</u> ibon <u>u</u> kleop <u>ro</u> tein (34 kDa) als Bestandteil bestimmter Spleißosomen
RNPC	spezifisches <u>R</u> ibon <u>u</u> kleop <u>ro</u> tein (22 kDa) als Bestandteil bestimmter Spleißosomen
SmB	<u>S</u> mith-Protein B (28 kDa); „Core“-Protein der Spleißosomen
SmD	<u>S</u> mith-Protein D (16 kDa); „Core“-Protein der Spleißosomen, (als Mischung aus einem rekombinanten und einem synthetisch erzeugten SmD)
Ro/SSA60	Bestandteil der kleinen zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexe hY-RNP; involviert in Translation ribosomaler mRNAs (60 kDa)
Ro/SSA52	Bestandteil der kleinen zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexe hY-RNP; involviert in Translation ribosomaler mRNAs (52 kDa)
La/SSB	Phosphoprotein als Bestandteil der kleinen zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Komplexe hY-RNP, die an der Terminierung der RNA-Polymerase III-Transkription beteiligt sind (48 kDa)
Rib-P	saures <u>P</u> hosphoprotein (36 kDa) ribosomaler RNPs für Elongation der Translation (Proteinbiosynthese), Syn.: RPP
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>o</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen (36 kDa); Cyclin und Helferprotein der DNA-Polymerase δ
CENPB	<u>C</u> entromer <u>p</u> rotein B (80 kDa); beteiligt an der koordinierten Segregation der Chromosomen sich teilender Zellen
Scl 70	erstmalig beschrieben an einem Patienten mit <u>S</u> clerodermie (70 kDa); DNA-Topoisomerase I
Jo-1	(50 kDa); Histidyl-tRNA-Synthetase

Zusätzlich werden mit dem Test Autoantikörper gegen natives Histon (H1) und gegen dsDNA humanen Ursprungs untersucht.

4. Testprinzip

Der Großteil der Antigene im *recomLine ANA/ENA* wird in *E.coli* Zellen oder Sf21 Insektenzellen hergestellt und anschließend mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt. Somit wird eine optimale Präsentation dieser Antigene gewährleistet, da störende und kreuzreagierende Antigene entfernt werden.

Die rekombinanten, hochgereinigten Proteine werden auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Zusätzlich werden natives Histon, humane dsDNA und eine Mischung aus einem rekombinanten SmD und einem synthetisch hergestellten SmD aufliniert. Diese Matrix wird anschließend in Streifen geschnitten.

Für die Testdurchführung werden die Teststreifen mit verdünntem humanem Serum oder Plasma inkubiert, wobei sich die Antikörper an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen und die Streifen in einem zweiten Schritt mit anti-human-IgG inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheint an der entsprechenden Stelle eine dunkle Bande auf dem Streifen.

Am oberen Ende der Teststreifen befinden sich untereinander zwei Kontrollbänder:

1. Die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.
2. "Cutoff Kontrolle": zur Kontrolle des Färbeprozesses bzw. Auswertung der Teststreifen. Die Intensität dieser Bande erlaubt die Beurteilung der Reaktivitäten in positiv, fraglich oder negativ.

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Waschpuffer A (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypyron (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g	Magermilchpulver
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 10 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Antigenen, nativem Histon, humaner dsDNA und einer Mischung aus rekombinant und synthetisch hergestelltem SmD
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG Konjugat (hundertfach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1%)
TEMPEVAL	1	Auswerteschablone

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser (hohe Qualität), Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

Inkubationsschalen (sind bei Bedarf von der MIKROGEN GmbH zu beziehen),

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid, MIT (Methylisothiazolon) und Chlorazetamid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Kommen in verschiedenen *recomLine*-, *recomBlot*- und ImmunoBlot-Testen die gleichen Reagenzien zum Einsatz (siehe Symbol-Aufdruck), können diese parameter- und chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.

Vor Gebrauch die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenseren ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Streifen sind mit der fortlaufenden Nummer, sowie dem Testkürzel gekennzeichnet.

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Die Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3 Herstellung der Lösungen

7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers A

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschritte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers A für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer A-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer A ist geruchlos und leicht getrübt.

Tabelle 1: Waschpuffer A pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer A-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Herstellung der Konjugatlösung

Die Konjugatlösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG-Konjugat-Konzentrats wird mit 100 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer A verdünnt (1 + 100).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Tabelle 2: Volumina der Anti-human-IgG-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen *	IgG-Konjugat-Konzentrat	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) bringen. Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

7.4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2 °C - 8 °C lagern.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2 °C - 8 °C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von lipämischen, hämolysierten oder trüben Proben kann einen dunklen Hintergrund im *recomLine ANA/ENA IgG* ergeben. Diese Proben können darüber hinaus zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt (siehe 6). In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A pipettiert. In die mit Waschpuffer A gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Die Streifen müssen vollständig mit Waschpuffer A benetzt und untergetaucht sein.

Verwendete Röhrchennummer und Streifennummer im Auswertebogen notieren.

2. **Probenzugabe**

Testdurchführung: **20 µl** einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) werden je Inkubationsansatz zum Teststreifen pipettiert. (Verdünnung 1 + 100)

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer A einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden (Gefahr der Kreuzkontamination).

9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer A abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 9.3).

9.6 Substratreaktion

1. In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert |
2. Sobald die Cutoff-Kontrollbande (in der Regel nach 4 Minuten) zu sehen ist, wird der Färbeprozess beendet, indem das Substrat abgesaugt wird.

9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein.
3.	jeweils 20 µl von der Probe einpipettieren
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; etwa 4 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren.
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen

11. Auswertung

11.1 Bewertung der Bandenintensität

1. Notieren Sie im beigefügten Auswertebogen Datum und Chargen-Nummer, sowie die detektierte Antikörperklasse.
2. Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
3. Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Inkubations-Kontrollbande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
4. Identifizieren Sie nun die Banden der entwickelten Teststreifen anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens und tragen diese in das Protokollblatt ein. Nehmen Sie dazu anhand der Tabelle 3 die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden vor.
5. Als zusätzliche Orientierungshilfe kann die beiliegende Auswerteschablone benützt werden.

11.2 Kontrollergebnisse

Eine Auswertung des Tests kann erfolgen, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Reaktionskontroll-Bande (oberste Linie) deutlich gefärbt, dunkle Bande
- Cutoff-Kontrolle (zweite Bande): schwache, aber sichtbare Färbung

Tabelle 3: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Banden	Intensität
negativ und schwächer als die Cutoff-Bande	-
gleiche Intensität wie die Cutoff-Bande	±
etwas stärkere Intensität als die Cutoff-Bande	+
stärkere Intensität als die Cutoff-Bande	++
sehr starke Intensität	+++

11.3 Testergebnisse

Zur Auswertung des Testergebnisses müssen die Antigenbanden deutlich erkennbar sein; die Hintergrundreaktion darf nicht zu stark sein. Treffen diese Anforderungen nicht zu, so ist der Test zu wiederholen.

Banden, die mit „-“ zu bewerten sind, gelten als negatives Ergebnis. „+/-“ bewertete Intensitäten sind grenzwertig und bedürfen einer weiteren Überprüfung (ggf. durch ein Folgeserum).

Zeigt mindestens eine Bande eine stärkere Intensität als die Cutoff-Bande („+“ oder stärker), ist das Testergebnis als positiv zu bewerten.

Teststreifenauswerte-Software: *recomScan*

Die *recomScan*-Software ist zur Unterstützung der Interpretation der **recomLine ANA/ENA**-Teststreifen bestimmt.

Weitere Informationen hierzu erhalten Sie auf Anfrage bei MIKROGEN.

Achtung:

Verwenden Sie nicht die automatisierte Interpretation ohne die unten beschriebenen Hinweise zur Interpretation zu beachten.

11.4 Testinterpretation

Einige der nachzuweisenden antinukleären Antikörper (ANA) sind spezifisch für einen der Kollagenosetypen und stellen damit serologische Marker mit einem hohen diagnostischen Aussagewert dar. Signifikante serologische Marker sind Autoantikörper gegen folgende Antigene:

- Rib-P für SLE
- PCNA für SLE
- Scl 70 für Progressive Systemische Sklerodermie
- CENP-B für das CREST-Syndrom
- RNP 68 für MCTD
- Jo-1 für Myositis

Die weiteren, mit dem *recomLine ANA/ENA IgG* detektierbaren antinukleären Antikörper sind weniger spezifisch für eine bestimmte Kollagenose, sondern können bei verschiedenen Kollagenosetypen auftreten. Dies kann eine eindeutige Zuordnung in einen der Krankheitstypen erschweren. Zur Hilfestellung werden in Tabelle 4 die Häufigkeiten der Beteiligung der einzelnen Autoantikörper in Prozent, bezogen auf den jeweiligen Kollagenosetyp aufgelistet.

Der Vergleich des resultierenden Antigenmusters mit den Häufigkeiten in Tabelle 4 liefert eine sinnvolle Unterstützung bei der Unterscheidung zwischen den verschiedenen Kollagenosetypen.

Es wird darauf hingewiesen, dass Abweichungen von der vorgeschriebenen Testprozedur zu Fehlbeurteilungen führen können. Die vorgeschriebenen Inkubationszeiten sind unbedingt einzuhalten.

Alle Testergebnisse sollten als Ergänzung zum klinischen Bild betrachtet werden. Zur Festlegung der Diagnose einer rheumatischen Autoimmunerkrankung sind neben den Laborwerten in jedem Fall auch die klinischen Befunde und die zugehörige Anamnese mit einzubeziehen.

Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Autoimmunerkrankung nicht aus.

Dunkle Teststreifen: Manche Seren von Patienten können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

Tabelle 4: Häufigkeiten in %

	SLE	SjS	MCTD	PSS*	Myositis	Blutspender	Problemseren
RNP68	10	0	81	5	0	1	1
RNPA	11	0	69	0	0	0	0
RNPC	16	0	69	0	0	0	2
SmB	20	0	38	0	0	0	1
SmD**	16	0	0	0	0	0	2
Ro/SSA60	20	77	13	5	9	0	0
Ro/SSA52	32	91	38	9	50	1	2
La/SSB	7	77	0	5	14	1	1
Rib-P	11	0	0	0	5	2	2
PCNA	0,5	0	0	0	0	0	0
CENPB	1	0	13	95	0	0	0
Sci 70	0,5	0	0	9	0	0	0
Jo-1	1	0	0	5	55	0	0
Histon H1	10	0	19	0	0	0	2
dsDNA***	21	0	0	0	0	1	0

Anzahl der Seren, die für die Evaluierung verwendet wurden: SLE (n=226), SjS (n=43), MCTD (n=16), PSS (n=22), Myositis (n=22), Blutspender (n=200), Problemseren (n=401).

Die Problemseren setzten sich wie folgt zusammen: EBV (n=47), Borrelien (n=42), Yersinien (n=13), Schwangere (n=95), Andere Autoimmunerkrankungen (Immunvaskulitiden, Rheumatoide Arthritiden) (n=74), ikterische Seren (n= 40), hämolytische Seren (n=42), lipämische Seren (n=48)

* Limitierte und diffuse Formen der PSS

** das im *recomLine* ANA/ENA IgG verwendete SmD wurde ab Dezember 2005 in verbesserter Form eingesetzt. Die Häufigkeiten des SmD wurden entsprechend neu ermittelt. Serenanzahl: SLE (n=108), SjS (n=4), MCTD (n=3), PSS (n=17), Myositis (n=15), Blutspender (n=100), Problemseren (n=50) (10 Schwangere, 10 ikterische, 10 lipämische, 10 hämolytische und 10 Rheumafaktor positive Seren).

*** Die Bestimmung der Antikörper gegen dsDNA wurde ab März 2007 neu eingeführt. Die Häufigkeiten der Autoantikörper gegen dsDNA wurden mit folgenden Serenzahlen ermittelt: SLE (n=117), SjS (n=5), MCTD (n=3), PSS (n=27), Myositis (n=8), Blutspender (n=100), Problemseren (n=50) (10 Schwangere, 10 ikterische, 10 lipämische, 10 hämolytische und 10 Rheumafaktor positive Seren).

12. Klinische Ergebnisse

12.1 Spezifität: Ermittelt anhand von negativen Seren und Problemseren

	recomLine ANA/ENA IgG			
	gesamt	negativ	fraglich	positiv
Blutspender	200	189	10	1
Potentiell kreuzreagierende EBV-, Borrelien- u. Yersinieninfektionen u. Schwangere	197	174	18	5
Definiert negative	17	17	0	0
Problemseren in der Laborroutine Ikterische, Hämolytische u. Lipämische Seren	130	116	10	4
Andere Autoimmunerkrankungen Immunvaskulitiden, Rheumatoide Arthritis	74	67	4	3
Spezifität				
Wertung nur positiver Befunde	98 %			
Wertung auch fraglicher Befunde als positiv	91,1 %			

12.2 CDC-Seren

Die nachfolgende Tabelle zeigt die in der *recomLine* ANA/ENA-ermittelte Wiederfindung der Autoantikörper von 9 Seren, die von der Arthritis Foundation und CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt und durch Indirekte Immunfluoreszenz bzw. Ouchterlony Immundiffusion spezifiziert wurden. Diese Seren gelten als Referenzseren und wurden in weiteren Laboratorien bestätigt.

Informationen zu den Seren sind bei MIKROGEN erhältlich und eine ausführliche Beschreibung liefert Smolen et al.

	CDC #1	CDC #2	CDC #3	CDC #4	CDC #5	CDC #6	CDC #7	CDC #8	CDC #9	CDC #10	CDC #12
CDC*	Native dsDNA	La/SSB	RNP La/SSB SSA	RNP	Sm	Muster: nukleolär	Ro/SSA	Muster centromer	Sci70	Jo-1	Rib-P
RNP68	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RNPA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RNPC	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SmB	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SmD	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ro/SSA60	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ro/SSA52	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
La/SSB	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rib-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PCNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CENP-B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Sci 70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Jo-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Histon H1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dsDNA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Die CDC-Seren sind

- a.) durch konventionellen Ouchterlony Immunodiffusionstest bestimmt. In dem Fall sind die positiven Antigene angegeben. (Laut CDC ist es durchaus möglich, dass weitere Antigene positiv bestimmt werden können.)
- b.) durch Indirekte Immunfluoreszenz bestimmt, wobei dann die IFT-Muster angegeben sind.

12.3 Sensitivitäten: Ermittelt anhand von definierten Seren (definiert über klinisches Bild und / oder spezifisches Antigenmuster)

Definierte Seren	Anzahl getestet	positiv	Sensitivität (%)
SLE	165	106	64
SjS	43	41	95
PSS	22	20	91
MCTD	16	16	100
Myositis	18	12	67

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 22.

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zum Thema der rheumatischen Autoimmunerkrankungen.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 23.

recomLine ANA/ENA IgG

Immuno-line assay based on recombinant respectively native antigens for the determination of IgG antibodies against **extractable nuclear antigens of autoimmune rheumatic diseases (collagen vascular diseases)** in human serum or plasma.

1. General aspects

The *recomLine* ANA/ENA is an in-vitro test, designed for the detection and the identification of IgG antibodies against characteristic cytoplasmatic and nuclear antigens in human serum or plasma.

This line-assay is designed as a confirmatory assay in order to distinguish between rheumatic diseases caused by autoimmune disorders and those of other origin.

2. Autoimmune rheumatic diseases

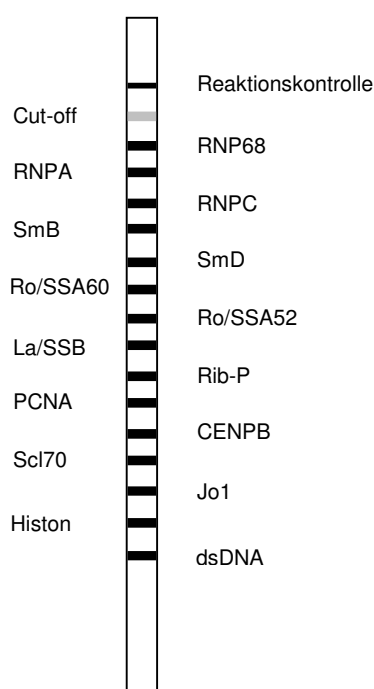
Autoantibodies are immunoglobulins which are directed against endogenous structures and can be detected in serum, plasma and other body fluids. In the case of collagen vascular diseases, connective tissue is affected, which leads to inflammation, loss of elasticity and joint pain. According to their clinical symptoms, these diseases are assigned to the rheumatic disorders, otherwise known as connective tissue diseases (CTD):

- Systemic lupus erythematosus (SLE)
- Sjögren`s syndrome (SjS)
- Mixed connective tissue disease (MCTD)
- Progressive systemic scleroderma (PSS)
- Myositis

Although the pathogenetic significance of the autoantibodies is not fully understood yet, the determination of the autoantibodies is of utmost importance with regard to differential diagnosis.

3. Diagnosis

Recombinant antigens, native histone, dsDNA of human origin and a mixture of recombinant and synthetic SmD are immobilised on a nitrocellulose membrane in the following sequence:



13 recombinant antigens are used for this test:

RNP68	specific ribonucleoprotein (68 kDa) as a component of spliceosomes
RNPA	specific ribonucleoprotein (34 kDa) as a component of spliceosomes
RNPC	specific ribonucleoprotein (22 kDa) as a component of spliceosomes
SmB	<u>S</u> mith- <u>p</u> rotein <u>B</u> (28 kDa); core-protein of the spliceosomes
SmD	<u>S</u> mith- <u>p</u> rotein <u>D</u> (16 kDa); core-protein of the spliceosomes, (as a mixture of recombinant and synthetic SmD)
Ro/SSA60	component of the small cytoplasmatic ribonucleoproteincomplexes hY-RNP; participates in translation of ribosomal mRNA
Ro/SSA52	component of the small cytoplasmatic ribonucleoproteincomplexes hY-RNP; participates in translation of ribosomal mRNA
La/SSB	phosphoprotein as a component of the small cytoplasmatic ribonucleoproteincomplexes hY-RNP which are involved in the termination of RNA-polymerase-III-transcription
Rib-P	acidic phosphoprotein (36 kDa) of ribosomal RNPs necessary for translation, syn.: RPP
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen (36 kDa); cyclin and assistant protein of DNA-polymerase δ
CENPB	<u>C</u> entromer <u>p</u> rotein <u>B</u> (80 kDa); participates in the segregation of the chromosomes in dividing cells
Scl 70	DNA-topoisomerase I (100 kDa)
Jo-1	histidyl-tRNA-synthetase (50 kDa)

In addition, the test detects antibodies to Histone, which is presented as native Histone 1 and antibodies to double-stranded DNA of human origin.

4. Test principle

The majority of antigens in the *recomLine ANA/ENA* are derived from *E. coli* cells or Sf21 insect cells and are highly purified by chromatographic methods. Therefore, an optimised presentation can be achieved by omitting the other disturbing and crossreactive antigens.

The recombinant, highly purified proteins, native histone, dsDNA and a mixture of recombinant and synthetic SmD are applied to a nitrocellulose membrane. This matrix is then cut into strips.

The strips are incubated with the diluted serum or plasma sample, whereby the antibodies bind to the antigens on the strips. Unbound antibodies are then flushed away and the strips are incubated in a second step with anti-human IgG coupled with horse radish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by means of a colour reaction catalysed by the peroxidase. If an antigen-antibody reaction has taken place, a dark band appears at the corresponding locus on the strip.

Two control bands are arranged side-by-side at the upper end of the test strip:

1. The reaction control band next to the strip number, which must show a reaction to every serum.
2. "Cutoff control": For control of the coloration and evaluation of the test strip. The intensity of this band provides a basis for evaluation of the reactivity as positive, equivocal or negative.

5. Package contents

The reagents in a pack are sufficient for 20 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Wash buffer A (ten times the concentration) contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent and preservatives MIT (0,1%) and Oxypyrrion (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Substrate solution Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
MILKPOW	5 g	Skim milk powder
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TESTSTR	2 piece	Test tubes with 10 consecutively numbered test strips, coated with recombinant antigens, native histone and a mixture of recombinant and synthetic SmD
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG conjugate (green screw cap, hundred times the concentration) from rabbit, contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamide (<0,1%)
TEMPEVAL	1	Evaluation template

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water (high quality), vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

Incubation trays (can be obtained from MIKROGEN GmbH)

7. Information on test and reagents

7.1 Precautions

- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide, MIT (methylisothiazolone) and Chloracetamide. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least 1 hour.
- ☞ Use incubation trays only once.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2°C - 8°C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18°C - 25°C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Identical reagents (according to the printed symbols) in all *recomLine*-, *recomBlot* and *ImmunoBlot*-tests can be used irrespective of parameter or lot. Please mind the expire date of the components.

Mix the concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The remaining strips must be left in the tube and stored further at 2°C - 8°C (reclose tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

The strips are consecutively numbered and marked with the shortcut of the respective test.

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Please protect all kit components from direct sun light.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3 Preparation of solutions

7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer A

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer A required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer A concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks. Ready-to-use wash buffer A is slightly turbid and scentless.

Table 1: Wash buffer A per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer A concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Preparation of conjugate solution

The conjugate solution is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG conjugate concentrate is diluted with 100 parts of ready-to-use wash buffer A (1 + 100).

See Table 2 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Table 2: Volumes for anti-human IgG conjugate dilution

Test strips used *	IgG conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips, etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

7.4 Storage and stability

Store reagents at 2°C - 8°C before and after use.

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or turbid samples may result in a dark background in the *recomLine* ANA/ENA IgG. These samples may also result in false results and should therefore not be used.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C - 8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or below. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 9.3. and 9.5 should therefore always be maintained.

9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray (see 6) is required per serum to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer A is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with wash buffer A using a plastic forceps. The strip number must face upwards.

Important!

The strip must be completely wet and immersed in the wash buffer A.

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

Test procedure: 20 µl of an undiluted sample (human serum or plasma) is pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer A and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

Important!

Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid (risk of cross-contamination).

9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

Important!

When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.

In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer A in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer A is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2) into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 9.3).

9.6 Substrate reaction

1. Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate shaking gently and under observation, at room temperature.
2. As a rule staining takes about 4 minutes. Watch the staining process. You should terminate the reaction as soon as the cutoff control band can be seen.

9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

10. Summary of the Test procedure

1.	bring all reagents to room temperature
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer A and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer A
3.	pipette 20 µl of the sample
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for about 4 minutes
10.	wash the strips at least three times with deionised water
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result

11. Evaluation

11.1 Evaluation of band intensity

1. On the enclosed evaluation sheet, record the date, lot and tube number along with the antibody class detected.
2. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
3. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
4. Now identify the bands of the developed test strips based on the printed control strip on the evaluation sheet and record them in the protocol sheet (Table 3). Identify the bands on the test strips.
5. In addition the enclosed evaluation template can be used.

11.2 Control results

The test can be evaluated if the following criteria are met:

- Reaction control band (upper line) pronounced colour, dark band
- Cutoff control (second band): weak, but clearly evident colouring.

Table 3: Intensity of bands in relation to the cutoff band

Bands	Intensity
No bands or weaker than cutoff	-
same intensity as cutoff	±
slightly stronger intensity than cutoff	+
stronger intensity than cutoff	++
very strong intensity	+++

11.3 Test results

Clear antigen bands and low background interference are essential for analysis. It is otherwise recommended to repeat the test.

No bands on a strip or only one with „+/-“ is a negative result. More bands with an intensity „+/-“ is a borderline result and requires further verification (subsequent serum withdrawal).

If one band shows a stronger reactivity than the cutoff („+“ or stronger), the test result is positive.

Test strip interpretation software: *recomScan*

The *recomScan* software is designed for support of the interpretation for **recomLine ANA/ENA** test strips.

You will receive further information on request from MIKROGEN.

Warning:

Please do not use the automated interpretation without taking into account „Directions for Interpretation“ mentioned below.

11.4 Testinterpretation

Some of the anti-nuclear antibodies are specific for one of the connective tissue diseases.

Antibodies to the following autoantigens are significant serological markers with respect to the disease as listed following:

- Rib-P for SLE
- PCNA for SLE
- Scl 70 for Progressive Systemic Scleroderma
- CENP-B for the CREST-Syndrome
- RNP 68 for MCTD
- Jo-1 for Myositis

All the other antinuclear antibodies, that are detectable by the *recomLine* ANA/ENA are less specific with respect to a distinct type of connective tissue disease, but may occur in different types of CTD. This makes a definite assignment to one of the disease types more difficult. As an aid for diagnosis, the frequencies of the separate autoantibodies are listed in Table 4 (in %, related to the respective type of collagenosis).

Comparing the resulting antigen patterns with the frequencies in Table 4 provides an useful means for the distinction between the single diseases.

It should be noted that deviations of the test instructions may lead to false interpretations. The prescribed incubation times must be strictly respected.

All test results are to be considered in conjunction with the clinical picture. In order to establish the diagnosis of rheumatic autoimmune diseases, the clinical results as well as the corresponding anamnesis should be taken into account.

A negative test result does not exclude the possibility of an autoimmune disease.

Dark test strips:

A few sera of patients may generate a dark general or patterned coloration on the whole nitrocellulose strip (e.g. sera of patients with milk protein allergies). Different factors of the individual patient sera account for these effects. The evaluation of these strips is usually possible only with some restrictions. E.g. „inverse“ bands (white bands on dark background) are assessed as negative. The corresponding serum should strictly be retested by use of other serological methods.

Table 4: Frequencies in %

	SLE	SjS	MCTD	PSS*	Myositis	Blood donors	Potentially interfering sera
RNP68	10	0	81	5	0	1	1
RNPA	11	0	69	0	0	0	0
RNPC	16	0	69	0	0	0	2
SmB	20	0	38	0	0	0	1
SmD**	16	0	0	0	0	0	2
Ro/SSA60	20	77	13	5	9	0	0
Ro/SSA52	32	91	38	9	50	1	2
La/SSB	7	77	0	5	14	1	1
Rib-P	11	0	0	0	5	2	2
PCNA	0,5	0	0	0	0	0	0
CENPB	1	0	13	95	0	0	0
Scl 70	0,5	0	0	9	0	0	0
Jo-1	1	0	0	5	55	0	0
Histon H1	10	0	19	0	0	0	2
dsDNA***	21	0	0	0	0	1	0

Determination of the frequencies with the following numbers of sera: SLE (n=226), SjS (n=43), MCTD (n=16), PSS (n=22), Myositis (n=22), Blood donors (n=200), Potentially interfering sera (n=401).

The potentially interfering sera consists of ** EBV (n=47), Borrelia (n=42), Yersinia (n=13), Pregnant women (n=95), **other rheumatic autoimmune diseases** (Immunvasculitis, rheumatoid arthritis) (n=74), icteric sera (n= 40), haemolytic sera (n=42), lipaemic sera (n=48)

* Limited and diffuse forms of PSS

**the SmD on the *recomLine* ANA/ENA IgG has been employed in improved version from Dec. 05 on. The frequencies of the improved SmD have been determined separately. Numbers of sera: : SLE (n=108), SjS (n=4), MCTD (n=3), PSS (n=17), Myositis (n=15), Blood donors (n=100), and potentially interfering sera (n=50) (10 pregnant women, 10 icteric, 10 haemolytic, 10 lipaemic and 10 rheumatoid factor positive sera).

*** The autoantigen dsDNA was newly established in March 07. The frequencies of autoantibodies against dsDNA have been determined by following numbers of sera: SLE (n=117), SjS (n=5), MCTD (n=3), PSS (n=27), Myositis (n=8), blood donors (n=100) and potentially interfering sera (n=50) (10 pregnant women, 10 icteric, 10 haemolytic, 10 lipaemic and 10 rheumatoid factor positive sera).

12. Clinical results

12.1 Specificity: Derived from negative sera and problematic sera

	<i>recomLine</i> ANA/ENA IgG			
	total	negative	equivocal	positive
blood donors	200	189	10	1
possible cross-reactive sera of EBV-, Borrelia- and Yersinia-infections and of pregnant women	197	174	18	5
defined negative	17	17	0	0
problematic sera in laboratory routine Icteric, haemolytic and lipaemic sera	130	116	10	4
other rheumatic autoimmune diseases Immunvasculitis, rheumatoid arthritis	74	67	4	3
specificity				
taking into account only positive sera	98 %			
taking into account positive and equivocal results	91,1 %			

12.2 CDC-Sera

The following table shows the confirmation of autoantibodies by *recomLine* ANA/ENA in 9 sera, that have been provided by the Arthritis Foundation and CSC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). These reference sera have been specified by indirect Immunofluorescence resp. Ouchterlony Immune Diffusion.

Further information about the sera are obtainable at MIKROGEN. A comprehensive description is provided by Smolen et al.

	CDC #1	CDC #2	CDC #3	CDC #4	CDC #5	CDC #6	CDC #7	CDC #8	CDC #9	CDC #10	CDC #12
CDC*	Native DNA	La/SSB	RNP La/SSB SSA	RNP	Sm	Pattern nucleolar	Ro/SSA	Pattern centromer	Scl70	Jo-1	Rib-P
RNP68	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RNPA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RNPC	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SmB	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SmD	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ro/SSA60	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ro/SSA52	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
La/SSB	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rib-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PCNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CENP-B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Scl 70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Jo-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Histon H1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dsDNA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*the CDC sera are specified by

- Conventional Ouchterlony Immun Diffusion Test. The antigens found positive are indicated (but: According to CSC it is possible that also antibodies to other antigens could be detected).
- Indirect Immunofluorescence. In this case the fluorescence pattern is given.

12.3 Sensitivities derived from defined sera (defined by clinical picture and/ or specific antigen patterns)






Defined Sera	Number tested	positive	sensitivity (%)
SLE	165	106	64
SjS	43	41	95
PSS	22	20	91
MCTD	16	16	100
Myositis	18	12	67

13. Literature

- (1) Tan E. M. **Autoantibodies as diagnostic markers and messengers from the immune system** In: Conrad K. et al. *Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies. 4th Dresden Symposium 21-24.10. 1998 Pabst1998, 20-31*
- (2) Lange R., et al. **Autoimmunerkrankungen (III) Grundlagen der humoralen Autoimmundiagnostik.** *mta* 14, 804-811 (1999)
- (3) Hiepe F. **The particle nature of intracellular autoantigens** In: Conrad K. et al. *Autoantigenes and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. 5th Dresden Symposium 18.-21.10. 00; Pabst 2000, 26-38*
- (4) Fritzier M.J. et al. **Autoantibodies to the mitotic apparatus: Biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity** In: Conrad K. et al. *Autoantigenes and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. 5th Dresden Symposium 18.-21.10. 00; Pabst 2000,58-86*
- (5) Conrad K. et al. **Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen.** Pabst 2006, 2. Auflage
- (6) Wick M. et al. **Labordiagnostik von Autoimmunerkrankungen.** *mta* 8, 1157-1162 (1993)
- (7) Heinz H.P. **Der rheumatische Formenkreis.** *mta* 1, 17-23 (1986)
- (8) Smolen JS. et al. **Reference sera for antinuclear antibodies. II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and Western blotting.** *Arthritis Rheum* 40(3), 413-418 (1997)
- (9) Damoiseaux J. et al. **Evaluation of a Novel Line-Blot Immunoassay for the Detection of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1050:340-347 (2005)
- (10) Eissfeller P. et al. **Comparison of Different Test Systems for Simultaneous Autoantibody Detection in Connective Tissue Diseases.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1050:327-339 (2005)
- (11) Damoiseaux J. et al. **From ANA to ENA: How to proceed?** *Autoimmunity Reviews* 5:10-17 (2006)
- (12) Arbuckle M.R. et al. **Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus.** *N ENGL. J MED* 349;16:1526-1533 (2006)
- (13) Espinosa A. et al. **The Sjögren's Syndrome-Associated Autoantigen Ro52 Is an E3 Ligase That Regulates Proliferation and Cell Death.** *The Journal of Immunology* 176:6277-6285 (2006)
- (14) Frank M.B. et al. **The Association of Anti-Ro52 Autoantibodies with Myositis and Scleroderma Autoantibodies.** *Journal of Autoimmunity* 12:137-142 (1999)
- (15) Rutjes S.A. et al. **Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy.** *Clin Exp Immunol* 109:32-40 (1997)
- (16) Peene I. et al. **Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease.** *Ann Rheum Dis* 61:929-933 (2002)
- (17) Mahler M. et al. **Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylation of an arginine residue as a specific target of a subpopulation of anti-Sm antibodies.** *Arthritis Res Ther* 7:R19-R29 (2005)
- (18) Mahler M. et al. **Improved Serological Differentiation between Systemic Lupus Erythematosus and mixed Connective Tissue Disease by Use of an SmD3 Peptide-Based Immunoassay.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:107-113 (2005)
- (19) Mahler M. et al. **Technical and Clinical Evaluation of Anti-ribosomal P Protein Immunoassays.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18:215-223 (2004)
- (20) Mahler M. et al. **International Multicenter Evaluation of Autoantibodies to ribosomal P Proteins.** *Clinical and Vaccine Immunology* 13:77-83 (2006)
- (21) Mahler M. et al. **Characterization of the human autoimmune response to the major C-terminal epitope of ribosomal P proteins.** *J Mol Med* 81:194-204 (2003).
- (22) Riboldi P. et al. **Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus?.** *Autoimmunity* 38:39-45 (2005)

We will be pleased to send you further literature on rheumatic autoimmune diseases at your request.

14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests (number of tests)	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze (Anzahl der Ansätze)
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomLine ANE/ENA IgG		Artikel-Nr./ Article No.:	6072
Gebrauchsinformation/ Instructions for use:		GIRLAE008DE.DOC	
gültig ab/ valid from:		Juli/July 2007	
<p>MIKROGEN GmbH Floriansbogen 2-4 D-82061 Neuried Germany www.mikrogen.de</p>	<p>Tel: +49 (0)89 54 80 1-0 Fax: +49 (0)89 54 80 1-100</p> <p style="text-align: right;">mikrogen@mikrogen.de</p>		
<p>QM-SYSTEM zertifiziert durch: QM System certified according to:</p>			

