

MASTAZYME™ ENA Screen 7

Enzymimmunoassay zur qualitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 und Centromer in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the qualitative screening of autoantibodies to SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 and Centromere in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection des anticorps anti-SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 et anti-centromère dans le sérum et le plasma humain

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



**Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /
Usage *in vitro* uniquement**



Deutsch: Seiten 03–10



English: Pages 11–18



Français: Pages 19–27

MASTAZYME™ ENA Screen 7

REF 733023






12 x 8 Tests

Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:

Explanations of abbreviations and icons used on labels:

Explications des abréviations et icônes sur les étiquettes:

STRIPS		Mikrotiterstreifen	Microtiter strips	Films pour microplaque
CONTR	+	Positive Kontrolle	Positive control	Contrôle positif
CONTR	-	Negative Kontrolle	Negative control	Contrôle négatif
CAL	CO	Cut-off Kalibrator	Cut-off Calibrator	Calibreur Seuil
CONJ		HRP-Konjugat	HRP conjugate	Conjugué
DIL		Probenverdünnungspuffer	Sample diluent	Diluant d'échantillon
SUBS		TMB-Substrat	TMB substrate	TMB substrat
STOP		Stopplösung	Stopping solution	Solution d'arrêt
WASH	CONC	Waschpuffer	Washing buffer	Solution de lavage
LOT		Charge	Batch	Lot
REF		Bestellnummer	Order code	Référence
RTU		Gebrauchsfertig	Ready to use	Prêt à l'emploi
		Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
		Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarques importantes
		Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
		Lagerung bei	Storage	Conservation
		Reagenzien nicht zur Wiederbenutzung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

Inhalt	Seite
1. Einleitung	4
2. Testprinzip und Verwendungszweck	6
3. Packungsinhalt	7
4. Zusätzlich benötigte Materialien	7
5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	8
6. Lagerung und Stabilität	8
7. Probengewinnung und -handhabung	8
8. Testdurchführung	9
9. Auswertung und Interpretation	10
10. Testcharakteristika	10
11. Literatur	10

1. Einleitung

Im Allgemeinen wird die Bezeichnung „ENA“ (extrahierbare nukleäre Antigene) als Unterteilung der ANA (Anti-nukleäre Antikörper) gewählt. Unter ENA wird eine Gruppe autoimmunreaktiver Proteine zusammengefasst, die sich durch biochemische Methoden aus dem Zellkern isolieren lassen. Die ENA-Proteine sind mittlerweile eindeutig charakterisiert. Ihre klinische Relevanz und ihre Rolle in der Pathogenese diverser Autoimmunerkrankungen wird teilweise recht gut verstanden. Für viele Krankheitssymptome und/oder -formen ist nicht nur ein spezifischer Autoantikörper kennzeichnend, sondern es lassen sich immer wieder auch patientenspezifische Autoantikörpermuster finden. Die nachstehende Tabelle ist eine Zusammenstellung wichtiger ENA-Proteine und deren klinischer Bedeutung für die Diagnose einer Autoimmunerkrankung. Eine Tabelle kann allerdings in dieser Form nicht vollständig sein und ist auch nicht als Diagnoseschema verwendbar.

	SS-A (Ro)	SS-B (La)	Sm	Sm/RNP	Sci-70	Jo-1	Centromer
Systemischer Lupus erythematosus (SLE)	< 30 %	15 %	> 30 % (M)	> 35 %			
Lupus Nephritis	> 50 %	< 10 %					
Medikamenten-induzierter Lupus	> 30 %						
Sjögren-Syndrom	> 40 %	> 40 %					
Neonataler SLE	> 30 %						
ANA negativer SLE	> 60 %						
MCTD/ Sharp Syndrom				> 85 %			
Systemische Sklerodermie	< 30 %				> 65 % (M)		40–80 %
Raynaud Krankheit							~ 25 %
Primäre biliäre Zirrhose							10-30 %
Polymyositis	10–30 %					20–90 % (M)	

Antikörper gegen Autoantigene, die mit „M“ gekennzeichnet sind, werden als Schlüsselkriterium für die entsprechende Erkrankung angesehen.

SS-A

Antigen

SS-A („soluble substance A“) – auch als Ro (Robert) bezeichnet – ist ein Ribonucleoproteinkomplex, bestehend aus mindestens 4 kurzkettigen RNA-Molekülen und 2 Proteinen mit 60 kDa und 52 kDa Molekulargewicht. Der SS-A-Komplex weist eine hohe Homologie zu dem Calcium-bindenden Protein Calreticulin auf, von dem es molekular allerdings verschieden ist. Bei SS-A handelt es sich um ein funktionell konserviertes Protein, Isolate aus verschiedenen Species binden Anti-SS-A-Autoantikörper. Fast alle Anti-SS-A-Seren erkennen mehrere Domänen des nativen 60 kDa Proteins.

Klinische Relevanz

Ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Anti-SS-A-Antikörpern und Erkrankungen aus dem Lupus-Formenkreis sowie dem des Sjögren-Syndroms gilt als gesichert. Die prozentuale Häufung des Anti-SS-A konzentriert sich beim SLE auf die Verbindung mit Hautsymptomen und bei SLE-Schwangerschaften auf den neonatalen Lupus mit dem Risiko kongenitaler kardialer Reizleitungsstörungen. Gleichzeitige Expression von Anti-SS-A und Anti-SS-B weist beim SLE auf eine milde Verlaufsform hin. Bei so genannten „ANA-negativen“-Lupusformen oder subakut cutanem Lupus ist Anti-SS-A oft als einziger ENA-Autoantikörper nachweisbar. Die Konzentration der Anti-SS-A und der Anti-dsDNA-Autoantikörper korreliert beim SLE häufig mit der Krankheitsaktivität.

Anti-SS-A-/Anti-SS-B-Autoantikörper sind oft zusammen und mit hoher Inzidenz beim Sjögren-Syndrom nachweisbar; die Titer erreichen teilweise sehr hohe Werte. Niedrigere prozentuale Häufigkeitswerte werden für die Sklerodermie und Mischgewebsskollagenosen beschrieben.

Mit entsprechenden Konjugaten lassen sich Autoantikörper der Klassen IgG, IgM und IgA nachweisen, wobei nach dem derzeitigen Wissensstand nur dem IgG klinische und diagnostische Bedeutung zukommt.

SS-B

Antigen

Das SS-B-Antigen („soluble substance B“) – auch La (Lane) genannt – ist trotz ähnlicher Bezeichnung und klinischer Relevanz biochemisch nicht mit dem SS-A-Protein verwandt. SS-B ist ein rund 47 kDa großes Phosphoprotein, welches verschiedene RNAs (tRNA, rRNA) binden kann. Es wurden auch Komplexe mit SS-A-spezifischen RNA-Molekülen beschrieben. Physiologisch scheint SS-B an der Regulation der RNA-Polymerase III und an RNA-Transportvorgängen zwischen Cytoplasma und Zellkern beteiligt zu sein. ATPase-Aktivität und die Eigenschaft zur Trennung von DNA/RNA-Hybriden bestätigen diese Beobachtung.

Klinische Relevanz

Autoantikörper gegen SS-B treten fast ausschließlich in Verbindung mit Anti-SS-A auf. Sie werden nur beim Sjögren-Syndrom und dem SLE nachgewiesen. Anti-SS-B ist bei gleichzeitigem Vorliegen von Anti-SS-A-Antikörpern ein Hinweis auf eine milde Verlaufsform des SLE. Anti-SS-B allein wird indes fast nur bei Frühformen des Sjögren-Syndroms nachgewiesen. Neben SS-A liegen auch SS-B Antigene auf Herzmuskelfasern. Die Bindung von Anti-SS-A und/oder Anti-SS-B kann in der Schwangerschaft die Ursache kongenitaler kardialer Reizleitungsstörungen beim Neugeborenen sein.

Sm und Sm/RNP

Antigen

Das Sm-Antigen (Smith) wird von mindestens 9 verschiedenen Polypeptiden gebildet und ist physiologisch zusammen mit den nRNP-Proteinen an Spleißprozessen im Zellkern beteiligt. snRNAs binden an den Core-Komplex des Sm, welches aus mehreren definierten Proteinen B/B', D und E besteht. Als Bindungsdomäne für Antikörper wurden die Proteine B und D charakterisiert. Das im MASTAZYME™ Anti-Sm verwendete Antigen ist RNP-frei!

Das Sm/RNP-Antigen enthält neben dem Sm-Part auch verschiedene snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles), die zusammen mit den Proteinen B/B', D, E, F oder G und einer mRNA zum Spliceosom gehören. Antikörper gegen Sm binden fast immer auch an Sm/RNP. Gegen RNP gerichtete Antikörper erkennen eine Domäne, die von der Sm-spezifischen verschieden ist, aber zum selben Proteinkomplex gehört.

Klinische Relevanz

Gegen Sm gerichtete Autoantikörper können als Marker für einen HLA-DR4-assoziierten SLE gewertet werden, seltener sind sie auch ein Hinweis auf eine zugrunde liegende Bindegewebserkrankung. Sm-Antikörper werden zwar nur bei etwa 35 % der SLE-Erkrankungen nachgewiesen; die Spezifität des Nachweises ist aber sehr hoch. Eine Korrelation der Antikörpertiter mit der Aktivität der Erkrankung wurde beobachtet, die klinische Wertigkeit und Aussagekraft wird allerdings noch diskutiert. Autoantikörper gegen snRNP-Partikel sind ebenfalls typisch für SLE, sie werden aber auch bei Mischkollagenosen gebildet. Anti-snRNP wurde ferner nachgewiesen bei rheumatoider Arthritis, Sklerodermie, dem Sjögren-Syndrom und progressiver systemischer Sklerose.

Scl-70

Antigen

Spezifische Anti-Scl-70-Autoantikörper binden an die Topoisomerase I (Topo I), die im Zellkern vor allem an der Relaxierung von so genannter „supercoiled“ DNA beteiligt ist. Das native Protein der Topo I hat im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 100 kDa, jedoch sind auch kleinere Fragmente der Topo I proteolytisch aktiv. Scl-70 ist z. B. ein 70 kDa großes Degradationsprodukt des 100 kDa-Proteins. Das Enzym ist hoch konserviert, es sind Kreuzreaktionen mit Antiseren verschiedener Spezies möglich. Der Erhalt der Antigenkonformation ist für den spezifischen Nachweis wichtig.

Klinische Relevanz

Bei 10–30 % der Sklerodermie-Patienten lassen sich Anti-Scl-70-Antikörper nachweisen. Die Diagnose wird mit dem Nachweis von Anti-Scl-70 bestätigt, andere zugrunde liegende Krankheiten in Verbindung mit der Sklerodermie, wie z. B. einem SLE oder Sjögren-Syndrom, sind aber auch bei einem positiven Ergebnis nicht auszuschließen. Zwar ist die Häufigkeit des Antikörpers bei Mischkollagenosen gering, er kann aber hier als spezifischer Marker verwendet werden. Die Antikörper sind spezifisch für eine Sklerodermie, die Antikörpertiter korrelieren jedoch nicht mit der Aktivität der Erkrankung.

Jo-1

Antigen

Anti-Jo-1-Antikörper binden an die Histidyl-tRNA-Synthetase, einem Enzym der Proteinbiosynthese. Das Enzym kommt sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vor. Humane Antiseren binden aber nur an entsprechende Antigene höherer Eukaryonten oder an humane Proteine. Das Protein liegt im Cytoplasma – hier sind bei positiven Ergebnissen auch die typischen Immunfluoreszenz-Muster zu erkennen.

Klinische Relevanz

Anti-Jo-1-Antikörper korrelieren eng mit entzündlichen Muskelerkrankungen und können fast ausschließlich bei Myositis-Patienten nachgewiesen werden. 54 % der Jo-1-positiven Patienten hatten eine primäre Myositis, 40 % eine Dermatomyositis und bei 6 % war die Myositis mit einer anderen Bindegewebserkrankung assoziiert. Die klinischen Symptome der Jo-1-positiven Patienten zeigen eine eher für diese Gruppe typische Multisystembeteiligung, die so bei anderen Anti-Synthetase-Syndromen nicht vorzuliegen scheint.

Centromer

Antigen

Die Zielantigene für Anti-Centromer-Antikörper sind im wesentlichen die Centromer-Proteine CENP-A (16 Da), CENP-B (80 kDa) und CENP-C (140 kDa), wobei dem CENP-B die größte diagnostische Bedeutung zukommt. Darüber hinaus wurden auch Antikörper gegen CENP-D und CENP-F beschrieben. Antikörper gegen CENP-A, -B oder -C sind dabei gegen die innere und äußere Schicht der Kinetochore gerichtet; Anti-Centromer-Antikörper binden nicht an DNA.

Klinische Relevanz

Die Antikörper gegen Kinetochorproteine wurden häufig beim CREST-Syndrom beschrieben und sind hier ein Hinweis auf einen möglicherweise benignen Krankheitsverlauf. Bei anderen Kollagenosen sind Anti-Centromer-Antikörper seltener, sie sind jedoch in ca. 10–30 % der Raynauds-Patienten nachweisbar. Auch anscheinend gesunde Blutspender können in seltenen Fällen (0,08 % der weiblichen Blutspenderinnen) Anti-Centromer-Antikörper aufweisen.

Anti-Centromer-Antikörper werden z. T. in Verbindung mit AMA-M2-Antikörpern gefunden, ein gleichzeitiges Auftreten von Antikörpern gegen Scl-70 und Centromer scheint sich hingegen auszuschließen.

2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ ENA Screen 7 dient dem Nachweis von Autoantikörpern gegen die entsprechenden Autoantigene in Serum oder Plasma. MASTAZYME™ ENA Screen 7 ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

Das Testprinzip des ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-human-IgG bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete elektronische Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o. ä.) ermittelt werden.

3. Packungsinhalt

Der Testkit enthält genügend Reagenzien für $12 \times 8 = 96$ Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit einem Mischantigen bestehend aus SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 und Centromer
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
1 x 1,5 mL	Cut-off Kalibrator	humanes Plasma, enthält Antikörper gegen obige Antigene, gebrauchsfertig
1 x 1,5 mL	Negative Kontrolle	humanes Plasma frei von Antikörpern gegen obige Antigene, gebrauchsfertig
1 x 1,5 mL	Positive Kontrolle	humanes Plasma mit Antikörpern gegen obige Antigene, gebrauchsfertig
2 x 60 mL	Probenverdünnungs-Puffer	PBS Puffer mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	1 N H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
2 x 50 mL	Waschpuffer 10 x Konz.	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen

4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.
- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfallsdatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden.

Nach dem Öffnen ist das angebochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Probenverdünnungspuffer 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden.

8. Testdurchführung

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

Waschpuffer: Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 50 mL Konzentrat + 450 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Nicht benötigte MTP-Streifen sollten in der Hülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

8.2. Testablauf

Hinweis: Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben, des gebrauchsfertigen Cut-off-Kalibrators und der gebrauchsfertigen Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen bei RT für 15 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden, ca. 5 Minuten stehen lassen.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch anhand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

9. Auswertung und Interpretation

Qualitative Auswertung

Die berechnete Absorption der Probe wird mit der des Cut-off Kalibrators verglichen. OD-Werte über dem Cut-off sind als positiv, Werte unterhalb der Cut-off OD als negativ zu bewerten.

Normbereich:

Negativ: OD-Probe < OD Cut-off Kalibrator

Positiv: OD-Probe > OD Cut-off Kalibrator

Die optische Dichte des positiven Kalibrators muss mindestens doppelt so hoch sein wie die des Cut-off Kalibrators.

Interpretation der Ergebnisse

Kein Messergebnis darf für sich allein zu einer abschließenden Diagnose verwendet werden, sondern muss immer in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Befunden interpretiert werden.

Der Test erfasst als Screening-Test Autoantikörper, die gegen die Antigene SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 und / oder Centromer gerichtet sind. Eine Typisierung der Autoantikörper verbunden mit einer Antigenzuordnung kann mit dem ENA-Screen 7 nicht erfolgen.

10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ ENA Screen 7 wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

11. Literatur

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K.Conrad, R.-L. Humbel, M. Meurer, Y. Shoenfeld, E.M.Tan, 1998, Pabst Science Publishers
3. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
4. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists; Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000).

Contents	Page
1. Intended Use	12
2. Introduction	12
3. Principle of the Test	15
4. Kit Contents	15
5. Materials Required but not Provided	16
6. Warnings and Precautions	16
7. Storage and Stability	16
8. Specimen Collection and Handling	17
9. Assay Procedure	17
10. Results and Interpretation	18
11. Assay Performance	18
12. References	18

1. Intended Use

MASTAZYME™ ENA Screen 7 has been designed for the detection of specific antibodies against SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 and centromere in serum and plasma.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

2. Introduction

CLINICAL RELEVANCE

In general ENA's ("extractable nuclear antigens") are considered a subgroup of ANA ("anti-nuclear antibodies"). Extractable nuclear antigens can be isolated by various biochemical methods from the nucleus of eukaryotic cells, and most of them are well characterized. Their clinical relevance and their role in pathogenesis is widely accepted as well as the fact that for many diseases more than one autoantibody can be detected by diagnostic methods. The following table shows a summary of important autoantigens and their correlation with the onset or progress of various diseases. A table format, however, can only give a summary and is never complete or detailed enough to be used as a scheme for diagnosis.

	SS-A (Ro)	SS-B (La)	Sm	Sm/RNP	Scl-70	Jo-1	Centromere
Systemic Lupus erythematosus (SLE)	< 30 %	15 %	> 30 % (M)	> 35 %			
Lupus Nephritis	> 50 %	< 10 %					
Drug-induced Lupus	> 30 %						
Sjögren's Syndrome	> 40 %	> 40 %					
Neonatal SLE	> 30 %						
ANA negative SLE	> 60 %						
MCTD/ Sharp Syndrome				> 85 %			
Systemic sclerosis	< 30 %				> 65 % (M)		40–80 %
Raynaud's syndrome							~ 25 %
Primary biliary cirrhosis							10-30 %
Polymyositis	10–30 %					20–90 % (M)	

Autoantigens specified with "M" are considered as markers for the indicated disease

SS-A

Antigen

SS-A ("soluble substance A") and the so-called Ro protein (Robert) are identical. SS-A consists of at least 4 short RNA molecules and two proteins of 60 kDa and 52 kDa. Although SS-A and calreticulin – a calcium binding protein – show some homology both proteins are clearly distinct from each other in their amino acid sequences. Regulatory proteins are usually conserved among animal species, so human autoantibodies bind easily to SS-A proteins isolated from non-human origin. Anti-SS-A antibodies bind to several domains of the native 60 kDa protein.

Clinical relevance

A strong connection between anti-SS-A antibodies and lupus or lupus-like diseases is well accepted and confirmed in the literature (1). A high percentage of anti-SS-A is found within a group of SLE patients with skin involvement and among pregnant SLE patients with a newborn's risk of congenital heart block. The expression of both SS-A and SS-B indicates in most cases a mild progression of the disease. Sometimes SS-A can be the only autoantibodies found in so called „ANA negative“ and subacute cutaneous lupus patients. The autoantibody concentrations of anti-SS-A and anti-dsDNA correlate well with disease activity.

There is a high incidence of anti-SS-A and anti-SS-B for Sjögren's syndrome; antibodies reach high titers within this group of patients. Only a few patients suffering from scleroderma and mixed connective tissue disease express anti-SS-A and anti-SS-B.

Only IgG antibodies are of diagnostic and clinical interest to date, although specific antibodies of the IgM and IgA class can be detected in patient sera.

SS-B

Antigen

SS-B ("soluble substance B") and the so-called La protein (Lane) are identical. Despite almost identical names and quite similar clinical and diagnostic functions there is no homology between SS-A and SS-B regarding biochemical and molecular structures. SS-B is defined as a 47 kDa phosphoprotein associated with various RNAs like rRNA and tRNA. Even RNA molecules usually specific for SS-A proteins can bind to native SS-B. SS-B is involved in RNA transport from the nucleus to the cytoplasm. The protein is further part of the regulatory cascade of RNA polymerase III reactions. An ATPase activity and the ability to melt DNA/RNA hybrids support the view of the physiological functions of SS-B.

Clinical relevance

In many patient sera both antibodies to SS-A and SS-B are often co-expressed. Both antibodies are generally found exclusively in Sjögren's syndrome with an underlying SLE. Up to 15 % of SLE patients express anti-SS-B antibodies. SLE patients positive for SS-A and SS-B usually develop a less severe form of systemic lupus erythematosus.

Isolated SS-B antibody responses are limited to an early form of the Sjögren's syndrome. SS-A and SS-B proteins are both expressed on heart muscle fibres increasing the risk of congenital heart block in the newborns after binding the respective autoantibodies. Both IgG antibodies pass through the placenta during pregnancy.

Sm and Sm/RNP

Antigen

The Sm antigen (Smith) consists of at least 9 different polypeptides which, together with nRNP proteins, are part of the nuclear splicing complex. Various snRNAs bind to a core complex of the Sm protein built of clearly defined proteins B/B', D and E. Antibodies directed against Sm in patient sera mainly bind to proteins B and D. The Sm antigen coated to the solid phase in the MASTAZYME™ Anti-Sm assay contains B and D proteins; furthermore the Sm antigen does not contain any RNP moieties!

The Sm/RNP antigen, however, consists of various snRNPs (small nuclear ribonnucleoprotein particles) in addition to the Sm part. These snRNPs and the proteins B/B', D, E, F or G plus a mRNA molecule are part of the spliceosome. Anti-RNP antibodies bind to a specific domain of the Sm/RNP protein complex on the solid phase, which is different from the binding site of anti-Sm.

Clinical relevance

Anti-Sm antibodies are considered as a marker for HLA DR4 associated SLE, and in a few cases they are indicative of MCTD. Nevertheless anti-Sm is highly predictive for SLE. Although "only" 35 % of all SLE patients express anti-Sm, positive results are highly specific for SLE. A correlation between antibody titers and disease activity has been observed, the clinical relevance of this data, however, is still under discussion.

Anti-snRNP antibodies are found in SLE but they are also found in a higher frequency in MCTD. Patients suffering from rheumatic arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome and progressive systemic sclerosis can be found positive for anti-snRNP autoantibodies.

Scl-70

Antigen

Anti-Scl-70 antibodies bind to eukaryotic topoisomerase I (topo I) an enzyme located in the nucleus where it is involved in relaxation of supercoiled genomic DNA during replication. In SDS polyacrylamide gels topo I migrates at a size of 100 kDa, but smaller fragments even with proteolytic activity are also present, for example the Scl-70 antigen which is a 70 kDa fragment of the native 100 kDa topo I. Like other proteins involved in cellular regulation topo I is highly conserved among species leading to cross-reactions. An intact antigen conformation is most important for the detection of anti-Scl-70 autoantibodies.

Clinical relevance

Anti-Scl-70 is detectable in 20-30 % of scleroderma patients where the antibody is considered as a disease defining marker. In Scl-70 positive scleroderma cases other diseases like SLE or Sjögren's syndrome may also be present and must be excluded. The prevalence of anti-Scl-70 is low among MCTD patients but even there the presence of the antibody is highly predictive for mixed connective tissue diseases. Antibody titers usually do not correlate with disease activity in scleroderma.

Jo-1

Antigen

Histidyl-tRNA synthetase is the corresponding antigen for anti-Jo-1 antibodies. The enzyme is found in prokaryotic and eukaryotic organisms but only antigens derived from higher eukaryotes or the human antigen itself are detected by anti-Jo-1 autoantibodies. Immunofluorescence assays clearly show the distribution of the antigen in the cell, concentrated in the perinuclear cytoplasm according to its physiological function where it is involved in protein biosynthesis.

Clinical relevance

There is a strong correlation between anti-Jo-1 autoantibodies and inflammatory muscle diseases. Jo-1 is considered as a diagnostic marker for myositis. About 54 % of Jo-1 positives are found within patients suffering from primary myositis, 40 % were connected with dermatomyositis and 6 % of Jo-1 positive patients showed a myositis together with other connective tissue diseases. Multi-systemic disorders defined by Jo-1 can be separated from other symptoms connected with an anti-synthetase syndrome.

Centromere

Antigen

CENP-A (16 kDa), CENP-B (80 kDa) and CENP-C (140 kDa) are the main target antigens for anti-centromere antibodies with CENP-B. Further antigens like CENP-D and CENP-F are described but CENP-B is of most importance for diagnostic. Antibodies are directed against the inner and outer part of the kinetochor but do not bind to dsDNA molecules.

Clinical Relevance

Most frequently antibodies directed against kinetochor protein are associated with CREST syndrome and may be indicating a more benign disease progress. They are less common in within the other collagenoses, but approximately 10–30 % of Raynaud's patients are found positive. Even healthy blood donors may show anti-centromere antibodies especially in the group of female donors (0.08 %). Antibodies directed to CENP proteins are sometimes found together with AMA-M2 antibodies but never together with Scl-70 antibodies.

3. Principle of the Test

The principle of the test reaction can be described in four stages.

3.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to the antigens on the solid phase to form a stable immune complex. After a 30 minutes incubation at room temperature the wells are washed with prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

3.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After a 30 minutes incubation at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with washing buffer.

3.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and subsequently the colour development is stopped after 15 minutes incubation at room temperature by adding 1 N H₂SO₄ to the wells. The change in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

3.4 Reading and interpretation

The intensity of the colour is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

4. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. The strips and solutions have to be stored at 2–8 °C. The expiry date is mentioned on the labels.

12 strips	Microtiter strips	single strips each with 8 break-apart wells coated with an purified antigen mixture off: SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 and centromere
1 x	Frame holder	
1 x 1.5 mL	Cut-off Calibrator	human pool-plasma containing antibodies against the above listed antigens, diluted in buffer, ready to use
1 x 1.5 mL	Positive Control	human plasma containing antibodies against the above listed antigens, diluted in buffer, ready to use
1 x 1.5 mL	Negative Control	human plasma, diluted in buffer, ready to use
2 x 60 mL	Sample diluent	PBS solution contains preservative, ready to use
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready to use
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use
1 x 12 mL	Stopping solution	1 N sulfuric acid, ready to use
2 x 50 mL	Washing buffer	PBS/Tween buffer solution 10x concentrated to be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 minutes to avoid any crystals

5. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipettes
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter Plate Washer (in case of manual washing: wash bottle)
- Reagent tubes for the serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of higher quality

6. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest or swallow! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera and plasma or buffers based upon have been tested to HBsAg, HIV and HCV respectively with generally accepted methods and were found negative. Nevertheless, precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18–24 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots should be used and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within shelf life.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or reading (ELISA Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents especially the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided because possible irritations and acid burns could arise and there exists a danger of intoxication.

7. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted washing buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C.

The opened kit should be used within three months.

8. Specimen Collection and Handling

Both serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood which is aseptically drawn by venipuncture after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days. They should be kept at -20°C for a longer storage. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera must be prediluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

9. Assay Procedure

9.1. Preparation of Reagents

Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.

Washing buffer: Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. Any changes or modifications are within the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Put the unused microtiter strips back in the plastic bag and store them dry at 2–8 °C.

9.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for calibrators, controls and samples.

Note: Other incubation conditions might be possible. In case of modifications of the recommended test procedure (e.g. incubation temperature 37 °C instead of RT) the user has to validate assay performance.

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use cut-off calibrator and controls into the appropriate wells.
2. Incubate the plate at room temperature for 30 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
7. Dispense 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Incubate for 15 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.

10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended.

The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

10. Results and Interpretation

Qualitative Calculation

The calculated OD values for patient sera as mentioned above are compared with the value for the cut-off calibrator. If the value of the sample is higher, then it should be read as positive.

Normal range:

Negative: OD-sample < OD cut-off calibrator

Positive: OD-sample > OD cut-off calibrator

The positive calibrator must show an absorption value at least double the value received by the cut-off calibrator.

Interpretation of results

No single laboratory result should be used for a diagnosis only. The results should be interpreted together with other laboratory parameters and other clinical findings.

As screening assay the ELISA detects antibodies directed against the antigens SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 or centromere. The assay is neither suitable for antibody typing nor for the identification of antibody specificity.

11. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ ENA Screen 7 have been established and assessed according to the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

12. References

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K.Conrad, R.-L. Humbel, M.Meurer, Y.Shoenfeld, E.M.Tan, 1998, Pabst Science Publishers
3. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
4. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists; Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000).

	Sommaire	Page
1.	Domaine d'utilisation	20
2.	Introduction	20
3.	Principe du test	23
4.	Composition du coffret	23
5.	Matériel nécessaire mais non fourni	24
6.	Précautions d'utilisation	24
7.	Conservation et stabilité	25
8.	Prélèvement et transport des échantillons	25
9.	Procédure ELISA	25
10.	Résultats et interprétation	26
11.	Performances du test	26
12.	Bibliographie	27

1. Domaine d'utilisation

MASTAZYME™ ENA Screen 7 a été conçu pour la détection des anticorps spécifiques anti- SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 et anti-centromère dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

2. Introduction

En général les antigènes nucléaires solubles ENA (extractable nuclear antigens) sont considérés comme un sous-groupe des anticorps antinucléaires ANA (antinuclear antibodies). Les antigènes nucléaires solubles isolés par différentes méthodes biochimiques à partir du noyau des cellules eucaryotes sont pour la plupart d'entre eux bien caractérisés. Leur signification clinique et leur rôle dans la pathogénèse sont largement acceptés de même que pour une maladie auto-immune il peut être détecté plusieurs auto-anticorps. Le tableau non exhaustif ci-dessous présente les principaux auto-antigènes et leur corrélation avec l'apparition ou la progression de différentes maladies.

Prévalence des anticorps anti-ENA dans différentes maladies auto-immunes

	SS-A (Ro)	SS-B (La)	Sm	Sm/RNP	Scl-70	Jo-1	Centromère
Lupus érythémateux disséminé (LED)	< 30 %	15 %	> 30 % (M)	> 35 %			
Lupus néphrétique	> 50 %	< 10 %					
Lupus médicamenteux	> 30 %						
Syndrome de Sjögren	> 40 %	> 40 %					
Lupus érythémateux néonatal	> 30 %						
LED et ANA négatifs	> 60 %						
MCTD/Syndrome de Sharp				> 85 %			
Sclérose systémique	< 30 %				> 65 % (M)		40–80 %
Syndrome de Raynaud							~ 25 %
Cirrhose biliaire primaire							10-30 %
Polymyosite	10–30 %					20–90 % (M)	

(M) auto-antigènes spécifiques de la maladie auto-immune indiquée.

SS-A

Antigène

L'antigène SS-A (soluble substance A) et la protéine Ro (Robert) sont identiques. L'antigène SS-A est composé de quatre fragments d'ARN et deux protéines de 60 kDa et 52 kDa. Bien que le SS-A et la cal-réticuline soient des protéines très homologues elles ont des séquences d'acides aminés qui les différencient bien. Les protéines régulatrices sont souvent bien conservées dans le règne animal si bien que les autoanticorps s'associent facilement à des protéines SS-A d'origine non humaine. La plupart des anticorps anti-SS-A s'associent à différentes régions de la protéine native de 60 kDa alors que les anticorps dirigés contre la protéine de 52 kDa reconnaissent aussi la protéine dénaturée.

Intérêt clinique

Une association est bien connue entre la présence d'anticorps anti-SS-A et le lupus ou les syndromes lupiques. Un pourcentage élevé d'anticorps anti-SS-A est rencontré chez les sujets ayant un lupus érythémateux disséminé (LED) avec des problèmes dermatologiques ou chez la femme enceinte ayant un LED et risquant de transmettre un blocage cardiaque congénital à son nouveau-né.

L'expression des SS-A et des SS-B indique dans la plupart des cas une progression moyenne de la maladie. Les anticorps anti-SS-A sont parfois les seuls anticorps détectés chez les «ANA négatif» et chez les sujets ayant un lupus cutané subaigu. Les concentrations en auto-anticorps anti-SSA et anti-dsDNA corrélerent avec l'activité de la maladie.

Il existe une forte prévalence des anticorps anti-SS-A et anti-SS-B chez les patients atteints du Syndrome de Sjögren avec des titres très élevés. Seulement quelques patients atteints de sclérose en plaque ou de connectivite ont à la fois des anticorps anti-SS-A et anti-SS-B. Les anticorps de type IgG sont les seuls présentant un intérêt clinique et diagnostique à ce jour bien que des anticorps spécifiques IgA et IgM puissent être détectés dans les sérums des patients.

SS-B

Antigène

L'antigène SS-B (soluble substance B) et la protéine La (Lane) sont identiques. Malgré des noms presque identiques et des fonctions biologiques et cliniques presque semblables il n'y a aucune homologie entre l'antigène SS-A et l'antigène SS-B au niveau des structures biochimiques et moléculaires. L'antigène SS-B est une phosphoprotéine de 47 kDa associée à de nombreuses molécules d'ARN comme le rRNA et le tRNA. Les molécules de RNA généralement spécifiques des antigènes SSA peuvent s'associer à du SS-B natif. L'antigène SS-B est impliqué dans le transport de l'ARN du noyau vers le cytoplasme. La protéine est aussi impliquée dans la cascade de réactions de régulation de la RNA polymérase III. Une activité ATPase et sa capacité à s'associer à des hybrides ADN/ARN sont en faveur du rôle physiologique de l'antigène SS-B.

Intérêt clinique

Les deux anticorps sont souvent présents en même temps chez de nombreux patients. Les deux anticorps sont généralement trouvés exclusivement pour le Syndrome de Sjögren avec un LED associé. Les LED présentent des anticorps anti-SS-B dans plus de 15 % des cas. Les LED ayant des anticorps anti-SS-A et anti-SS-B développent en général une maladie moins sévère. Les réponses en anticorps anti-SS-B seuls sont limités aux formes précoces d'un Syndrome de Sjögren.

Les protéines SS-A et SS-B qui sont toutes deux exprimées au niveau des fibres du muscle cardiaque augmentent le risque de blocage cardiaque chez le nouveau-né après association avec les anticorps spécifiques. Les anticorps IgG des deux antigènes passent la barrière placentaire au cours de la grossesse.

Sm et Sm/RNP

Antigène

L'antigène Sm (Smith) contient 9 polypeptides différents qui font partie avec les protéines nRNP du complexe nucléaire d'épissage. Différents snRNA s'associent au noyau du complexe protéique Sm composé des protéines B/B', D et E. Les anticorps dirigés contre l'antigène Sm s'associent essentiellement avec les protéines B et D. L'antigène Sm coaté sur la phase solide du coffret MASTAZYME™ Anti-Sm contient les protéines B et D; de plus, l'antigène Sm ne contient aucune RNP.

L'antigène Sm/RNP, contient par contre les différentes snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles) en plus de la fraction Sm. Ces snRNP et les protéines B/B', E, F ou G plus la molécule mRNA font partie du spicosome. Les anticorps anti-RNP s'associent aux régions spécifiques du complexe protéique Sm/RNP spliceosome de la phase solide qui sont différentes des sites d'accrochage des anticorps anti-Sm.

Intérêt clinique

Les anticorps anti-Sm sont considérés comme un marqueur du LED associé au HLA DR4. Les anticorps anti-Sm ont une valeur prédictive élevée d'un LED. Bien que seulement 35 % des LED expriment les anticorps anti-Sm, les résultats positifs sont spécifiques du LED. Une corrélation entre le titre en anticorps et l'activité de la maladie a été observée mais la valeur clinique de ces données est encore discutée.

Les anticorps anti-snRNP sont trouvés chez le LED mais peuvent être trouvés également avec une fréquence élevée chez les connectivites mixtes. Les patients qui souffrent d'arthrite rhumatoïde, de sclérodermies, du Syndrome de Sjögren ou de sclérose systémique progressive peuvent être positifs en anticorps anti-snRNP.

Scl-70

Antigène

L'anticorps anti-Scl-70 s'associe à l'enzyme du noyau eucaryote appelée topoisomérase I (topoI) qui est impliquée dans le déroulement de l'ADN super enroulé au cours de la réplication. Sur gel d'électrophorèse en SDS, la topo I donne une bande de 100 kDa avec de plus petits fragments à activité protéolytique dont l'antigène Scl70 de 70 kDa. L'antigène Scl-70 est un fragment de la protéine native topo I de 100 kDa. Comme les autres protéines impliquées dans le processus de régulation cellulaire la topo I qui est très conservée parmi les espèces animales peut engendrer des réactions croisées. La conformation intacte de l'antigène est plus importante pour la détection des autoanticorps anti-Scl-70.

Intérêt clinique

Les anticorps anti-Scl-70 sont détectables dans 20 à 30 % des cas de sclérose en plaque ; ces anticorps sont considérés comme un marqueur de la maladie. Dans les cas de sclérose en plaque positifs en anticorps anti-Scl-70 d'autres maladies associées comme le LED ou une connectivite mixte peuvent être exclues. Bien que la prévalence des anticorps anti-Scl-70 parmi les patients ayant une connectivite mixte soit faible la présence de ces anticorps est fortement significative d'une connectivite mixte. Les titres en anticorps ne corréleront généralement pas avec une sclérodermie active.

Jo-1

Antigène

Histidyl-tRNA synthétase est l'antigène correspondant aux anticorps anti-Jo1. L'enzyme est rencontrée chez les procaryotes et les eucaryotes mais l'antigène seulement dérive des eucaryotes supérieurs ou l'antigène humain lui-même est détecté par les anticorps anti-Jo-1. La technique d'immunofluorescence montre que l'antigène est concentré dans la zone périnucléaire du cytoplasme cellulaire, lieu de la biosynthèse protéique dans laquelle il est impliqué.

Intérêt clinique

Il existe une corrélation étroite entre la présence de ces anticorps et les maladies inflammatoires du muscle. L'antigène Jo-1 est considéré comme un marqueur des myosites. Parmi les patients positifs en anticorps anti-Jo-1, 54 % d'entre eux souffrent de myosite primaire, 40 % ont une association avec une myosite dermatique et 6 % ont une myosite avec une connectivite tissulaire. Les désordres poly-systémiques définis par Jo-1 peuvent être différenciés des autres symptômes associés au syndrome anti-synthétase.

Centromère

Antigène

CENP-A (16 kDa), CENP-B (80 kDa) et le CENP-C (140 kDa) sont les plus importants antigènes cibles des anticorps anti-centromère avec le CENP-B. D'autres antigènes comme le CENP-D et le CENP-F ont été décrits mais le CENP-B présente le plus grand intérêt pour le diagnostic. Les anticorps sont dirigés contre les faces internes et externes du kinétochore mais ne se lient pas avec les molécules d'ADN.

Intérêt clinique

Les anticorps les plus fréquemment dirigés contre la protéine du kinétochore sont associées au syndrome de CREST et peuvent être le signe d'une progression de la maladie. Ils sont moins communs parmi les autres maladies du collagène mais environ 10–30 % des patients atteints par la maladie de Raynaud sont positifs. Les donneurs de sang sains peuvent avoir des anticorps anti-centromère et plus particulièrement les femmes donneurs (0,08 %). Les anticorps dirigés contre les protéines CENP sont parfois présents en même temps que les anticorps anti-M2 mais jamais en même temps que les anticorps anti-Scl-70.

3. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

3.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

3.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti- IgG humaine marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage

3.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppée après 15 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1 N dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

3.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 x	barrettes de microtitration	barrettes sécables de 8 puits coatées avec un mélange d'antigènes purifiés de SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 un mélange, Jo-1 et centromère.
1 x	Cadre de microplaque	
1 x 1,5 mL	Calibrateur Seuil	Plasma humains contenant des anticorps anti antigènes mentionnés haut dessus dilués en tampon, prêts à l'emploi.
1 x 1,5 mL	Contrôle positif	Plasma humains contenant des anticorps anti antigènes mentionnés haut dessus dilués en tampon, prêts à l'emploi.
1 x 1,5 mL	Contrôle négatif	Plasma humains dilués en tampon, prêts à l'emploi.
2 x 60 mL	Diluant d'échantillon	Solution tampon avec du PBS comme conservateur, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG humaines, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution Stop	Acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi.
1 x 50 mL	Solution de lavage	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10 X à diluer au 1:10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37 °C pour éviter la formation de cristaux.

5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Éviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs Éviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouvert le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas interchanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Éviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8 °C.

Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilués au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

9. Procédure ELISA

9.1. Préparation des réactifs

Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18–24 °C) avant utilisation et bien les mélanger.

Solution de lavage: Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au 1:10 avec de l'eau distillée (ex: 50 mL de solution de lavage concentrée + 450 mL d'eau distillée).
Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 2–8 °C.

9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour le calibrateur, les contrôles et les échantillons.

Remarque : **D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.**

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101) et du calibrateurs et des contrôles prêts à l'emploi dans les puits appropriés.
2. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 30 minutes.
3. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.

4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Incuber la microplaque pendant 15 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm .Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–690 nm est recommandée.

La couleur est stable pendant au moins 30 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.

10. Résultats et interprétation

Résultats qualitatifs

Les valeurs de DO nettes calculées pour les sérums des patients sont comparées avec la valeur du calibrateur Seuil. Si la valeur de l'échantillon est supérieure à la valeur du seuil, le résultat est positif.

Normal range:

Négatif: DO de l'échantillon < DO du calibrateur Seuil

Positif: DO de l'échantillon > DO du calibrateur Seuil

La valeur de DO du contrôle positif doit être au moins du double de celle obtenue pour le calibrateur Seuil.

Interprétation des résultats

Le diagnostic ne doit pas dépendre uniquement d'un seul test de laboratoire. Les résultats doivent être interprétés avec d'autres paramètres biologiques et en fonction des données cliniques.

Ce test ELISA de dépistage détecte les anticorps dirigés contre les antigènes SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 ou centromère. C test ne peut pas être utilisé pour le typage des anticorps ni pour l'identification de la spécificité des anticorps.

11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME™ ENA Screen 7 ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale

12. Bibliographie

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K.Conrad, R.-L. Humbel, M. Meurer, Y. Shoenfeld, E.M.Tan, 1998, Pabst Science Publishers
3. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
4. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists; Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000).

Hersteller / Manufactured by:
Fabriqué par:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

Distribué par:

MAST DIAGNOSTIC
115, Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Tél.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
service-commercial@mast-diagnostic.fr