REF 41414	ZENIT RA SS-A/Ro	Vertrieb durch
GEBRAUCHS-ANLEITUNG	IVD +2°C +8°C Σ 50	CE

VERWENDUNGSZWECK

Der Test *ZENIT RA SS-A/Ro* ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) für die quantitative Bestimmung, mit dem speziellen Analysegerät *ZENIT RA*, von spezifischen Antikörpern der Klasse IgG gegen SS-A/Ro in humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA).
Dieser Test dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Beurteilung von systemischen rheumatischen Autoimmunkrankheiten.
ACHTUNG: Ärztliche Entscheidungen dürfen nicht ausschließlich auf dem Ergebnis dieses Tests beruhen, sondern sind auf der Grundlage der Beurteilung aller verfügbaren klinischen und Labordaten zu treffen.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Autoantikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) sind eine umfangreiche Familie von Autoantikörpern, die weder organ- noch artspezifisch sind und deren Bestimmung von großer Bedeutung für die Labordiagnose von systemischen rheumatischen Autoimmunkrankheiten ist[1,2,3,4].
Bei Laboruntersuchungen zeichnen sich die systemischen Autoimmunkrankheiten durch das Vorliegen von antinukleären Autoantikörpern (ANA) aus. Der Test auf ANA ist der erste Autoantikörpertest, der bei Patienten mit Verdacht auf eine systemische Autoimmunerkrankung angefordert werden sollte. Die Suche nach ANA wird im Allgemeinen mit der indirekten Immunfluoreszenz-Methode (IIF) auf einer Einzelschicht von HEp-2-Zellen durchgeführt; ein positives ANA-Ergebnis mit IIF zeigt das Vorliegen von Autoantikörpern gegen verschiedene nukleäre (DNA, Histon, Nicht-Histon-Proteine, nukleoläre Antigene, usw.) oder zytoplasmatische Antigene an[5,6]. Ein positives ANA-Ergebnis mit einem relevanten Titer muss mittels der Bestimmung von ENA- und dsDNA-Antikörpern eingehender untersucht werden. Das Vorliegen eines positiven Ergebnisses für ANA und eines oder mehrerer spezifischer Ergebnisse für ENA- und/oder dsDNA-AK deutet stark auf systemische Autoimmunkrankheiten hin: systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sjögren-Syndrom (SS), progressive systemische Sklerose (PSS), Dermatomyositis/Polymyositis (DM/PM) und Mischkollagenose (MCTD).
Das Antigen SS-A/Ro besteht aus einem Uridin-reichen RNA-Partikel, der an ein 60-kDa-Protein gebunden ist[7]; ein weiteres Protein von 52 kDa ist dank einer Protein-Protein-Wechselbeziehung an dem Komplex beteiligt[8].
Das Antigen SS-B/La besteht aus RNA-Partikeln und einem Phosphoprotein von 48 kDa[9]. Zwischen den beiden verschiedenen Antigenen besteht keine direkte Wechselbeziehung; die Bindungsstellen sind

unabhängig, und zwischen den jeweiligen Autoantikörpern gegen SS-A/Ro und SS-B/La findet keine Kreuzreaktion statt. Beide Antigene liegen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vor.

Die Autoantikörper gegen SS-A/Ro sind polyklonale Antikörper der Klasse IgG, die konformationelle Epitope auf dem 60-kDa-Molekül und, in geringerem Ausmaß, auf dem 52-kDa-Molekül erkennen. Etwa die Hälfte der Seren mit SS-A/Ro-Antikörpern enthält Antikörper gegen beide Bestandteile, die andere Hälfte enthält nur Autoantikörper gegen eines der beiden Antigene. Einigen Autoren zufolge liegen AK gegen SS-A/Ro-52-kDa alleine fast nur bei Patienten mit Sjögren-Syndrom (SS) vor, während AK gegen SS-A/Ro-60-kDa nur bei Patienten mit SLE nachweisbar sind[10,11,12].

Auch die Autoantikörper gegen SS-B/La sind polyklonale Antikörper der Klasse IgG und erkennen verschiedene lineare und konformationelle Epitope[13]. Antikörper gegen SS-A/Ro liegen im Allgemeinen alleine vor, während AK gegen SS-B/La fast immer in Verbindung mit SS-A/Ro-AK zu finden sind[14].

Autoantikörper gegen SS-A/Ro stehen am häufigsten mit primärer (60-90 %) oder mit anderen Kollagenosen assoziierter SS in Verbindung, können jedoch auch bei SLE (15-50 %) oder, in geringerem Ausmaß, bei anderen Kollagenosen nachweisbar sein. Sie können auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis oder primärer biliärer Zirrhose vorliegen. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass die SS-A/Ro-AK die am häufigsten bei systemischen Autoimmunerkrankungen nachgewiesenen Antikörper sind. Antikörper gegen SS-A/Ro im Serum der Mutter können zur Entwicklung des sogenannten neonatalen Lupus führen, dessen bedeutendste und schwerwiegendste klinische Erscheinung ein kompletter angeborener atrioventrikulärer Block ist.

Autoantikörper gegen SS-B/La liegen hauptsächlich bei primärer (30-90 %) oder sekundärer (vor allem in Verbindung mit SLE, 5-40 %) SS und sehr viel seltener bei anderen Kollagenosen vor.

PRINZIP DER METHODE

Der Kit *ZENIT SS-A/Ro* für die quantitative Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen SS-A/Ro verwendet eine indirekte immunologische Methode in zwei Schritten auf der Grundlage des Chemilumineszenzprinzips.

Das spezifische Antigen wird zur Beschichtung der Magnetpartikel verwendet (Festphase), und ein Antikörper gegen humane IgG wird mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat).

Während der ersten Inkubation binden sich die spezifischen Antikörper in der Probe, in den Kalibratoren oder in den Kontrollseren an die Festphase.

Während der zweiten Inkubation reagiert das Konjugat mit den an die Festphase gebundenen SS-A/Ro-IgG-Antikörpern.

Nach jeder Inkubation wird das nicht an die Festphase gebundene Material durch Absaugen und anschließendes Waschen entfernt.

Die Menge des markierten Konjugats, das an die Festphase gebunden wurde, wird mittels Aktivierung der Chemilumineszenzreaktion und Messung des Lichtsignals bewertet. Das erzeugte Signal wird in relativen Lichteinheiten (RLU - Relative Light Units) ausgedrückt und zeigt die Konzentration der in der Probe, in den Kalibratoren und in den Kontrollseren vorliegenden spezifischen Antikörper an.

AUTOMATISIERUNG

Das Analysegerät *ZENIT RA* führt automatisch alle Schritte durch, die im Protokoll für den Test vorgesehen sind: Hinzufügen von Proben, Kalibratoren, Kontrollseren, Magnetpartikeln, Konjugat und Aktivierungslösungen für die Chemilumineszenz in den Reaktionsbehälter; magnetische Trennung und Waschen der Partikel; Messen des emittierten Lichts.
Das System berechnet die Testergebnisse der Proben und Kontrollseren mittels der gespeicherten Kalibrierungskurve und druckt einen Bericht aus, der alle Informationen bezüglich des Tests und des Patienten enthält.

MATERIALIEN UND REAGENZIEN

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

REAG	1	MP	2.5 mL

Magnetpartikel, beschichtet mit SS-A/Ro-Antigen, in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen, Pro-Clin 300 und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	2	CONJ	15 mL

Monoklonale Mausantikörper gegen humane IgG, mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat), in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	3	DIL	25 mL

Probenverdünnungsmittel: Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO_4 als Konservierungsmittel.

REAG	4	CAL A	1.6 mL

Humanserum mit niedriger Konzentration von SS-A/Ro-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO_4 als Konservierungsmittel.

REAG	5	CAL B	1.6 mL

Humanserum mit hoher Konzentration von SS-A/Ro-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO_4 als Konservierungsmittel.

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.
Die Reagenzien 1, 2 und 3 sind in einem gemeinsamen Behälter, der Reagenzienkartusche, zusammengestellt.
Die Konzentrationen der Kalibratoren sind in AU/ml (Arbitrary Units - willkürliche Einheiten) angegeben und gegen einen internen Referenzstandard kalibriert. Die für jede Produktcharge spezifischen Konzentrationswerte sind in der im Kit enthaltenen DATA DISK verzeichnet.

DATA DISK

Mini-DVD mit Informationen zu allen Produkte der Reihe ZENIT RA (Reagenzien, Kalibratoren, Kontrollseren), aktualisiert bis zur letzten Produktionscharge, unter Ausschluss der Produkte, die zum Zeitpunkt der Zusammenstellung der neuen DATA DISK abgelaufen sind.
Es reicht aus, die DATA DISK mit der höchsten Chargennummer aufzubewahren, um die für den korrekten Betrieb des Systems notwendigen Informationen auf dem jeweils aktuellsten Stand zu halten.

Benötigte, im Kit nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien

- ZENIT RA Analysegerät Best.-Nr. 41400

- ZENIT RA Cuvette Cube * Best.-Nr. 41402
  Packung mit 960 Küvetten

- ZENIT RA System Liquid * Best.-Nr. 41409
  1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 10x (Systemflüssigkeit).

- ZENIT RA Wash Solution * Best.-Nr. 41407
  1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 20x (Waschlösung).

- ZENIT RA Trigger Set * Best.-Nr. 41403
  1 Flasche mit 250 ml Trigger A (Voraktivierungslösung)
  1 Flasche mit 250 ml Trigger B (Aktivierungslösung)

- ZENIT RA D-SORB Solution Best.-Nr. 41436
  Packung mit 2 Flaschen mit je 1 Liter gebrauchsfertiger Lösung.

- ZENIT RA Cartridge Checking System * Best.-Nr. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Best.-Nr. 41566
  300 Verschlusskappen zum Verschließen der Kalibratorenbehälter nach der ersten Anwendung.

(*) Das Analysegerät ZENIT RA und die mit einem Sternchen identifizierten Zubehörteile werden von Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgien, hergestellt und von A. Menarini Diagnostics Srl vertrieben.

Andere empfohlene Reagenzien

ZENIT RA ANA CONTROL SET Best.-Nr. 41448

3 Fläschchen mit je 1,5 ml SS-A/Ro-AK-negativem Humanserum und 3 Fläschchen mit je 1,5 ml SS-A/Ro-AK-positivem Humanserum.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die mit dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* gelieferten Reagenzien dienen ausschließlich der In-vitro-Diagnostik und dürfen nicht in vivo bei Menschen oder Tieren verwendet werden.

Dieses Produkt ist von professionellen Anwendern unter strikter Beachtung der in diesem Dokument vorliegenden Anweisungen zu verwenden.

Menarini kann nicht für Verluste oder Schäden verantwortlich gemacht werden, die aus einer nicht den mitgelieferten Anweisungen entsprechenden Anwendung entstehen.

Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und ist daher wie Infektionserreger enthaltendes Material zu behandeln.

Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlicher Herkunft. Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Kit verwendeten Serum- oder Plasmaeinheiten wurden mit von der FDA genehmigten Methoden auf das Vorliegen von HBsAg, HCV-Antikörpern, HIV1-Antikörpern und HIV2-Antikörpern untersucht und für nicht reaktiv befunden.

Da jedoch keine Untersuchungsmethode die Abwesenheit von Krankheitserregern garantieren kann, sind alle Materialien menschlicher Herkunft als potentiell infiziert anzusehen und entsprechend zu handhaben.

Falls die Verpackung beschädigt wird und Reagenzien austreten, schützen Sie sich mit einer geeigneten persönlichen Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) und dekontaminieren Sie den betroffenen Bereich mit einer verdünnten Natriumhypochloritlösung.

Entsorgen Sie das für die Reinigung verwendete Material und die von dem Materialaustritt betroffenen Verpackungen gemäß den nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell infizierter Abfälle.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid mit Blei, Kupfer oder verbleitem Messing reagieren und so in den Abflussrohren explosive Azide bilden kann, wird empfohlen, die Reagenzien oder Abfälle nicht in den Abfluss zu entsorgen, sondern die nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell gefährlicher Abfälle zu befolgen.

Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten ist es notwendig, dass Sie sich strikt an diese Gebrauchsanleitung halten und die Angaben in der Bedienungsanleitung des Analysegerätes genau befolgen.

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind nur mit dem Analysegerät *ZENIT RA* zu verwenden.

Die Bestandteile der Reagenzienkartusche können nicht aus der Kartusche entfernt und neu zusammengestellt werden.

Den Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufbewahren.

Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzienkartusche und die Kalibratoren vor dem Öffnen bis zum Verfallsdatum haltbar.

Nach dem Öffnen kann die Reagenzienkartusche 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C oder im Gerät aufbewahrt wird.

Nach dem Öffnen können die Kalibratoren 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden und pro Lauf nicht länger als 6 Stunden im Gerät verbleiben.

Reagenzien und Kalibratoren nicht einfrieren.

ZUBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Die Bestimmung ist mit humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA) durchzuführen.

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer und trüber Proben wird abgeraten.

Wenn die Bestimmung mehr als 8 Stunden nach der Entnahme erfolgt, trennen Sie das Serum von dem Blutklumpen oder das Plasma von den roten Blutkörperchen und füllen Sie die Probe aus den primären Geltrennröhrchen in sekundäre Reagenzröhrchen ohne Zusätze um.

Vor der Untersuchung können die Proben höchstens 7 Tage lang im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Wenn die Bestimmung nach mehr als 7 Tagen durchgeführt wird, sind die Proben einzufrieren (< -20 °C).

Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

VERFAHREN

Halten Sie sich genauestens an die Anweisungen in der Bedienungsanleitung des Gerätes, um eine zuverlässige Analyseleistung zu erhalten.

Einsetzen der Reagenzien

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Vor dem Einsetzen der Kartusche in das System muss der Behälter mit den Magnetpartikeln durch horizontales Drehen geschüttelt werden, um die Resuspendierung der Partikel zu erleichtern. Dabei ist die Bildung von Schaum zu vermeiden.

Setzen Sie die Reagenzienkartusche mit Hilfe der entsprechenden Führung in den Reagenzienbereich des Gerätes ein und lassen Sie sie vor der Anwendung mindestens 30 Minuten lang schütteln.

Bei Einsetzen der Reagenzienkartusche wird gleichzeitig deren identifizierender Barcode abgelesen. Falls das Etikett der Kartusche beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Reagenzienkartusche von Hand eingegeben werden.

Das Gerät sorgt automatisch für das kontinuierliche Schütteln der Magnetpartikel.

Wenn die Reagenzienkartusche aus dem Gerät entfernt wird, ist sie bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufzubewahren.

Einsetzen der Kalibratoren und Kontrollseren

Die Kalibratoren und Kontrollseren des Systems ZENIT RA sind gebrauchsfertig. Lassen Sie die Kalibratoren und Kontrollseren 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und schütteln Sie vorsichtig den Inhalt, von Hand oder mit dem Vortex-Mixer, ohne dass sich dabei Schaum bildet. Den Behälter nicht umdrehen und die Perforationskappe nicht abnehmen (gelbe Kappe für Kalibratoren und grüne oder blaue Kappe für Kontrollseren).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren zum ersten Mal verwendet werden, drücken Sie die Perforationskappe bis zum Anschlag nach unten. Dadurch wird die Membran, die den Behälter versiegelt, perforiert, so dass die enthaltene Flüssigkeit entnommen werden kann. Die Absenkung der Perforationskappe wird angezeigt, indem gleichzeitig der rote Streifen am oberen Ende des Etiketts verdeckt wird (Abb. 1 - „Versiegelter Behälter“ und „Perforierter Behälter“).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren bereits verwendet wurden, ist der Behälter mit einer Verschlusskappe (weiße Kappe) versehen, und der rote Streifen des Etiketts ist verdeckt.

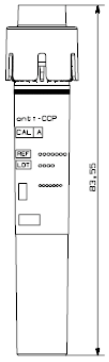
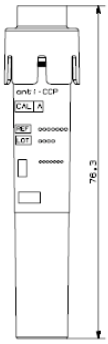
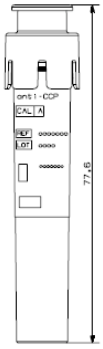
In das Gerät dürfen nur Behälter ohne Verschlusskappe (weiße Kappe) und mit verdecktem rotem Streifen des Etiketts eingesetzt werden (siehe Abb. 1 - „Perforierter Behälter“).

Setzen Sie nach Ablesen des Barcodes die Kalibratoren oder Kontrollseren in den Probenbereich des Gerätes ein. Falls das Etikett beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die Daten des Barcodes auch von Hand eingegeben werden.

Die Konzentrationswerte der in den Kalibratoren und Kontrollseren vorliegenden IgG-Antikörper gegen SS-A/Ro sind auf der DATA DISK verzeichnet und werden automatisch an das Analysegerät übertragen. Falls die Daten nicht übertragen werden, können sie von Hand eingegeben werden.

Am Ende des Laufs sind die Behälter der Kalibratoren und Kontrollseren mit den dafür bestimmten Verschlusskappen (weiße Kappen) zu verschließen und bis zu ihrer nächsten Anwendung bei 2-8 °C aufzubewahren (Abb. 1 - „Verschlossener Behälter“).
Die Kalibratoren können höchstens viermal verwendet werden.

Abbildung 1: Anordnung der Behälter

Versiegelter Behälter	Perforierter Behälter	Verschlossener Behälter
		

<u>Einsetzen der Proben</u>

Identifizieren Sie die Proben mit Hilfe des Barcodelesers und setzen Sie sie in das entsprechende Fach des Gerätes ein. Falls die Probe nicht mit einem Barcode versehen ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Probe von Hand eingegeben werden.
Wählen Sie für jede Probe die angeforderten Parameter aus.

<u>Kalibrierung</u>

Das Analysegerät *ZENIT RA* verwendet eine gespeicherte Kalibrierungskurve (Masterkurve), die vom Hersteller für jede Charge der Reagenzienkartuschen erzeugt wird.
Die Parameter der Masterkurve sind zusammen mit den Konzentrationswerten der Kalibratoren auf der DATA DISK gespeichert und werden in die Datenbank des Gerätes übertragen.
Die Kalibratoren A und B werden verwendet, um entsprechend dem verwendeten Gerät und den Reagenzien im Gerät die Masterkurve nachzukalibrieren.
Analysieren Sie zum Nachkalibrieren die beiden Kalibratoren A und B dreifach und die Kontrollseren einfach. Die mit den Kontrollseren erhaltenen Konzentrationswerte ermöglichen es, die neue Kalibrierung zu validieren.
Nachdem die Nachkalibrierung der Masterkurve akzeptiert und gespeichert wurde, können alle nachfolgenden Proben ohne weitere Kalibrierung analysiert werden, es sei den, es tritt einer der folgenden Fälle ein:

- eine Reagenzienkartusche einer neuen Charge wird in das Gerät eingesetzt;
- die Werte der Kontrollseren liegen nicht innerhalb des Akzeptanzbereiches;
- es wurden Wartungsverfahren am Gerät durchgeführt;
- die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve ist abgelaufen.

Die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve für den Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* beträgt 15 Tage.
Die Nachkalibrierung wird vom Gerät automatisch verwaltet.

Quantitative Bestimmung

Drücken Sie die Starttaste.

1. Das System saugt 80 µl Probenverdünnungsmittel, 40 µl Magnetpartikel, 100 µl Probenverdünnungsmittel und 4 µl Probe oder Kontrollserum an (für die Kalibratoren wird das positive Serum mit dem Probenverdünnungsmittel vorverdünnt geliefert, und das entnommene Volumen beträgt 104 µl). Die angesaugten Lösungen und Suspensionen werden in die Reaktionsküvette gegeben.
2. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
3. Nach dieser Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen.
4. In die Küvette werden 200 µl Konjugat gegeben.
5. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
6. Nach dieser letzten Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen, und die Küvette wird in die Messkammer überführt.
7. Die in RLU angegebene Menge des an die Festphase gebundenen Konjugats ist direkt proportional zu der Konzentration der in der Probe vorliegenden SS-A/Ro-IgG-Antikörper.
8. Die erhaltenen Ergebnisse werden auf die Kalibrierungskurve aufgetragen und in Konzentrationen umgerechnet.

Proben mit Konzentrationswerten über dem oberen Messgrenzwert können verdünnt und erneut getestet werden. Der neue Wert wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert, um das Endergebnis zu erhalten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Gültigkeit der Bestimmung zu garantieren, müssen an jedem Tag, an dem dieser Test durchgeführt wird, Kontrollseren mit unterschiedlichen Konzentrationen (mindestens ein negatives und ein positives Serum) gemessen werden.
Falls Ihr Labor für die Überprüfung der Ergebnisse der Bestimmung die häufigere Anwendung oder die Anwendung einer höheren Anzahl von Kontrollseren erfordert, befolgen Sie die im Labor festgelegten Qualitätskontrollverfahren.

Wenn Kontrollseren des Systems ZENIT RA verwendet werden, sind die erwarteten Mittelwerte und die Akzeptanzgrenzen in der auch mit den Kontrollseren gelieferten DATA DISK angegeben.
Falls andere Kontrollseren angewendet werden, sind vor deren Anwendung die mit den Reagenzien und dem System ZENIT RA erwarteten Werte zu bestimmen.
Wenn die Werte der Kontrollseren nicht in den angegebenen Akzeptanzbereich fallen, sind die zugehörigen Testergebnisse nicht gültig, und die entsprechenden Proben müssen erneut getestet werden.
In diesen Fällen ist es vor der Wiederholung der Bestimmung nötig, das Verfahren zur Nachkalibrierung durchzuführen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Das System berechnet automatisch die Konzentration der in den untersuchten Proben vorliegenden SS-A/Ro-IgG-Antikörper. Die Werte können auf dem Bildschirm eingesehen oder ausgedruckt werden.
Die Konzentrationen werden in AU/ml angegeben.
Die Konzentration des Analyten in der Probe wird berechnet, indem das erhaltene Ergebnis jeder Probe auf einer Kalibrierungskurve abgelesen wird; letztere wird mittels einer 4-Parameter-Logistic-Fitfunktion erstellt (4PL, Y erwogen) und regelmäßig entsprechend den mit der Bestimmung der Kalibratoren erhaltenen Ergebnisse korrigiert.

Detaillierte Informationen zur Berechnung der Ergebnisse durch das System finden Sie in dessen Bedienungsanleitung.

Interpretation der Ergebnisse

Der Messbereich für die quantitative Bestimmung mit *ZENIT RA SS-A/Ro* ist: 0,0 - 640 AU/ml.
Werte unter 0,0 AU/ml sind extrapolierte Werte und können als „gleich 0,0 AU/ml“ angegeben werden.
Werte über 640 AU/ml können als „über 640 AU/ml“ angegeben oder nach geeigneter Verdünnung erneut getestet werden.
Die Ergebnisse der Proben können wie folgt interpretiert werden:

(AU/ml)	Interpretation
< 10	Die Probe ist als negativ für das Vorliegen von SS-A/Ro-IgG-AK anzusehen.
≥ 10	Die Probe ist als positiv für das Vorliegen von SS-A/Ro-IgG-AK anzusehen.

Die obengenannten Werte sind nur vorgeschlagene Werte. Jedes Labor muss seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

Für Diagnosezwecke sind die mit dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* und dem Analysesystem *ZENIT RA* erhaltenen Ergebnisse zusammen mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden klinischen und Labordaten zu verwenden.
Eine bakterielle Verunreinigung der Proben und Wärmeinaktivierung können das Ergebnis der Bestimmung beeinträchtigen.
Heterophile Antikörper in Humanserumproben können mit Reagenzien auf Immunglobulinbasis reagieren und so immunologische In-vitro-Bestimmungen beeinträchtigen. Solche Proben können bei Analyse mit dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* zu abnormalen Werten führen.

ERWARTETE WERTE

Es wurden Proben von 100 zufällig ausgewählten Spendern untersucht, um das Vorliegen von SS-A/Ro-IgG-Antikörpern zu überprüfen.
99 Proben waren negativ, mit einem Mittelwert von 1,4 AU/ml und einer Standardabweichung von 0,84 AU/ml.
Mit diesen Ergebnissen wurde die Erfassungsgrenze berechnet („Limit of Blank“, LoB = der höchste Wert, der in einer Reihe von Proben ohne den Analyten erwartet werden kann). Die Erfassungsgrenze wurde als das 95. Perzentil der negativen Bevölkerung bestimmt und liegt bei 3,2 AU/ml mit der Reagenziencharge 2.

LEISTUNGEN

Warnung: Die angegebenen Daten stellen nicht die Funktionsspezifikationen des Kits dar, sondern sind der experimentelle Nachweis dafür, wie der Kit auf die vom Hersteller vorgesehene Art innerhalb dieser Spezifikationen funktioniert.

Präzision und Wiederholbarkeit

Für die Bewertung der Präzision und Wiederholbarkeit des Kits *ZENIT RA SS-A/Ro* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP5-A2 des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) verwendet.
Die ***Präzision*** wurde berechnet, indem die Ergebnisse von 20 Wiederholungen von vier Seren (ein negatives und drei positive mit verschiedenen Konzentrationen von SS-A/Ro-IgG-AK), die mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen während desselben analytischen Laufs untersucht wurden, analysiert wurden.
Die Konzentration des für SS-A/Ro-IgG-AK negativen Serums (NC) lag zwischen 0,5 und 1,4 AU/ml bzw. zwischen 0,5 und 1,4 AU/ml mit den Reagenzienchargen 1 bzw. 2.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3 positiven Seren.

Probe	Reagenziencharge Nr.	Mittlere Konzentration (AU/ml)	SD	VK%
LP	1	32,7	1,05	3,2
	2	35,9	1,10	3,1
MP	1	97,7	3,12	3,2
	2	104,7	3,22	3,1
HP	1	142,4	2,78	2,0
	2	171,7	4,22	2,5

Die ***Wiederholbarkeit*** wurde berechnet, indem die Ergebnisse der einfachen Bestimmung von fünf Seren (ein negatives und vier positive mit verschiedenen Konzentrationen von SS-A/Ro-IgG-AK), durchgeführt in 30 verschiedenen Läufen mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen, analysiert wurden.
Die Konzentration des für SS-A/Ro-IgG-AK negativen Serums (N1) lag zwischen 0,0 und 0,1 AU/ml.
Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 4 positiven Seren.

Probe	Mittlere Konzentration (AU/ml)	SD	VK%
P1	22,5	1,63	7,2
P2	33,6	2,04	6,1
P3	93,5	5,44	5,8
P4	152,6	14,06	9,2

Linearität der Verdünnungen

Für die Bewertung der Linearität der Verdünnungen des Kits *ZENIT RA SS-A/Ro* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP6-A des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) verwendet.
Es wurden Verdünnungsreihen von 2 Seren mit hoher Konzentration von SS-A/Ro-IgG-AK bestimmt; die Verdünnungen wurden mit dem Probenverdünnungsmittel durchgeführt.
Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gemessene Konzentration (AU/ml)	Erwartete Konzentration (AU/ml)	Wiederfindung %
1	1	346,9	-	(100)
	2	194,7	173,5	112,2
	4	108,6	86,7	125,3
	8	53,6	43,4	123,5
	16	24,5	21,7	112,9
2	1	369,1	-	(100)
	2	204,1	184,6	110,6
	4	114,4	92,3	123,9
	8	59,5	46,1	129,1
	16	30,7	23,1	132,6

Es ist darauf hinzuweisen, dass möglicherweise nicht alle Seren bei Messung verschiedener Verdünnungen innerhalb des Messbereiches lineare Ergebnisse erbringen, da das Ergebnis nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Affinität der in der Probe vorliegenden Antikörper abhängt.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Kits *ZENIT RA SS-A/Ro*, die als ***Nachweisgrenze*** *(Limit of Detection - LoD*, d.h. die geringste Menge des Analyten, die mit der Methode gemessen werden kann) angegeben wird, wurde mit einem Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP17-A des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und mit der Gleichung $LoD = LoB + C_\beta SD_s$ bewertet (wobei LoB die Erfassungsgrenze und SD_s die geschätzte Standardabweichung der Verteilung der Probe mit niedriger Konzentration ist und C_β vom 95. Perzentil der Standard-Gaußverteilung abgeleitet wird).

Es wurden 4 Proben mit niedriger Konzentration des Analyten verwendet, die in 30 verschiedenen Versuchen mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen einfach bestimmt wurden.

Als Nachweisgrenze des Kits *ZENIT RA SS-A/Ro* wurde 4,5 AU/ml bestimmt.

Zusammen mit klinischen Überlegungen und den Ergebnissen von Vergleichen mit Referenzmethoden hat der Wert der Nachweisgrenze zur Definition des Cut-Off-Wertes beigetragen.

Analytische Spezifität: Interferenzen

Eine Studie auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP7-A2 des CLSI hat gezeigt, dass das Vorliegen der nachfolgend angeführten, potentiell interferierenden Substanzen in der Probe bis zu den untersuchten Konzentrationen die Leistung des Tests nicht beeinträchtigt.

Potentiell interferierende Substanzen	Höchste untersuchte Konzentration
Freies Bilirubin	20 mg/dL
Konjugiertes Bilirubin	28 mg/dL
Hämoglobin	1000 mg/dL
Fettsäuren	3000 mg/dL

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer oder trüber Proben wird jedoch abgeraten.

Analytische Spezifität: Kreuzreaktionen

Um eventuelle Kreuzreaktionen des für die Sensitivierung der Mikropartikel verwendeten Antigens zu beurteilen, wurde eine Untersuchung mit 14 Proben durchgeführt, die alle hohe Konzentrationen anderer Autoantikörper aufwiesen und negativ für SS-A/Ro-IgG-AK waren.
Die verwendeten Proben setzten sich wie folgt zusammen: Scl 70 (1), dsDNA (1), Cenp B (2), Histon (1), nukleoläre AK (1), β_2-GPI/CL IgG (1) und Gliadin/t-TG (3), RF (2), MPO (1) und PR3 (1).
Die Untersuchung hat keine bedeutsamen Kreuzreaktionen des Antigens in der Festphase mit den anderen Autoantikörpern gezeigt.

Sättigungseffekt bei hohen Konzentrationen

Einige immunologische Methoden können unterschätze Werte für den Analyten anzeigen (Hook-Effekt), wenn sie zur Bestimmung von Proben mit extrem hohen Analytenkonzentrationen verwendet werden.
Da die von dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* verwendete Methode eine Methode mit zwei Inkubationen ist, ist sie von diesem Effekt nicht betroffen.
Eine Probe mit einer extrem hohen Konzentration (oberhalb des Messbereiches) von IgG-Antikörpern gegen SS-A/Ro hat bestätigt, dass bis zu einer Konzentration von 10000 AU/ml kein Hook-Effekt eintritt.

Relative Sensitivität und Spezifität

Das Vorliegen von IgG-Antikörpern gegen SS-A/Ro wurde in 411 Proben mit dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* und mit einer im Handel erhältlichen ELISA-Methode bestimmt. Bei 6 Proben stimmten die Ergebnisse des ZENIT-RA-Tests und des im Handel erhältlichen ELISA-Tests nicht überein.

Die ***relative Übereinstimmung*** ist daher 98,5 % (405/411).
Die ***relative Sensitivität*** ist 100 % (64/64).
Die ***relative Spezifität*** ist 98,3 % (341/347).

Referenzserum

Die Menge der SS-A/Ro-IgG-Antikörper in der Probe „ANA HUMAN REFERENCE SERUM # 7“ (CDC, Best.-Nr. IS2105, Chargen-Nr. 83-0026), die mit dem Kit *ZENIT RA SS-A/Ro* gemessen wurde, lag bei 230 AU/ml.

LITERATUR

1. CA von Mühlen, EM Tan. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Sem Arthr Rheum 1995; 24: 323-58.

2. RL Humbel. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie. In : Humbel RL, ed. Autoanticorps et maladies autoimmunes, Paris,France : Edition Scientifiques Elsevier; 1997: 17-20.

3. PN Hollingsworth, SC Pummer, RL Dawkins. Antinuclear antibodies. In : Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam, The Netherlands : Elsevier Science BV; 1996: 74-90.

4. CA Slater, RB Davis, RH Shmerling. Antinuclear antibodies testing. A study of clinical utility. Arch Int Med 1996; 156: 1421-5.

5. RL Humbel. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In : van Venrooij, Maini RN eds. Manual of biological markers of disease. Dordrecht, the Netherlands : Kluwer; 1993: A2:1-16.

6. National Committee for clinical Laboratory Standarditation. Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen (IF-ANA). Approved guideline. Wayne, PA: NCCLS I/LA2-A, vol 16(11); 1996.

7. PJ Venables, PR Smith, RN Maini. Purification and characterization of the Sjögren's syndrome A and B antigens. Clin Exp Immunol 1983; 54: 731-8.

8. E Ben-Chetrit, EKL Chan, KF Sullivan, EM Tan. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988;167:1560-71.

9. RL Slobbe, GJM Pruijn, van Venrooij WJ. Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes . structure, function and antigenicity. Ann Med Interne 1991; 142: 592-600.

10. E Ben-Chetrit, R Fox, EM Tan. Dissociation of immune responses to the SS-A(Ro) 52-kD and 60-kD polypeptides insystemic lupus erythematosus andv Sjögren's syndrome. Arthr Rheum 1990; 33: 349-55.

11. RL Slobbe, GJM Pruijn, WG Damen, JW van der Kemp, WJ van Venrooij. Detection and occurrence of 60 and 52 kD Ro(SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins. Clin Exp Immunol 1991; 86: 99-105.

12. JG Routzias, AG Tzioufas, M Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. Epitope mapping of the Ro/SSa 60 kD autoantigen reveals disease-specific antibody binding profiles. Eur J Clin Invest 1996; 26 : 514-21.

13. RH Scofied, AD Farris, AC Horsfall, JB Harley. Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. Arthritis Rheum 1999; 42: 199-209.

14. AG Tzioufas, HM Moutsopoulos. Clinical significance of autoantibodies to SS/A and La/SSB. In : van Venrooij WJ, Maini RN, eds. Manual of biological markers of disease. Dordrecht : Kluwer Academic Publ 1996; C4.1 : 1-14.

TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italien

AUSTRIA

Vertrieb durch
A. Menarini G.m.b.H
Pottendorfer Strasse, 25-27 - A - 1120 Wien
Tel. +43 1 80 41 5760 - Fax +43 1 80 43 194
www.menarinidiagnostics.at

GERMANY

Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics Deutschland
Eine Division der Berlin-Chemie AG
Glienicker Weg 125 - 12489 Berlin
Tel. +49 30 67 07 30 00 - Fax +49 30 67 07 30 20
www.menarinidiagnostics.de