

Nur für “*In-Vitro* Diagnostik”

Verwendungszweck

NOVA Gel™ Scl-70 ist ein Doppeldiffusionstest für die Titrierung und den semi-quantitativen Nachweis von Autoantikörpern gegen Scl-70, einem extrahierbaren nukleären Antigen (ENA) im Humanserum. Die Gegenwart von Antikörpern gegen Scl-70 kann in Verbindung mit anderen serologischen Tests und klinischen Befunden bei der Diagnose von Sklerodermie behilflich sein.

Informationen zum Test

Unter den Begriff „antinukleäre Antikörper“ (ANA) fallen verschiedene Autoantikörper, die mit den Bestandteilen des Zellkerns, einschließlich DNA, RNA sowie mehreren Proteinen und Ribonukleoproteinen reagieren.¹ Diese Autoantikörper treten sehr häufig bei Patienten mit Bindegewebs- oder rheumatischen Erkrankungen auf, vor allem bei SLE. Fast alle SLE-Patienten sind ANA-positiv. Diese diagnostische Empfindlichkeit führte zu einer Implementierung des ANA-Tests in die 1982 von einem Subkomitee der Arthritis and Rheumatism Association (Gesellschaft für Arthritis and Rheumatismus) überarbeiteten Kriterien für die Klassifizierung von systemischem Lupus Erythematodes.² Auch wenn der ANA-Test ein ausgezeichneter Screening-Test für SLE ist (ein negatives Ergebnis schließt aktiven SLE praktisch aus³), ist es doch kein spezifischer Test.

Der aktuelle Trend bei der Diagnose und Verwaltung von Bindegewebserkrankungen ist eine Kombination des empfindlichen ANA-Screening-Tests mit spezifischeren nachfassenden Tests, wie z.B. dsDNA und/oder ENA. ENA-Tests sind besonders wichtig, da sie sowohl diagnostische als auch prognostische Informationen liefern.

Antikörper gegen Scl-70 sind spezifische Marker für Sklerodermie,^{2,4} ähnlich wie Antikörper gegen Sm und native DNA spezifische Marker für SLE sind. Der Scl-70-Antikörper ist bei 20-60% der Patienten mit Sklerodermie vorhanden.^{2,4,5,6} Dieser weite Bereich für die Häufigkeit von Scl-70-Antikörpern ist wahrscheinlich auf Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Tests zurückzuführen.⁷ Bei Einteilung der Sklerodermie in eine leichtere Form mit Varianten des CREST-Syndroms und eine schwere Form mit diffuser oder progressiver Sklerodermie, treten Scl-70 Antikörper häufiger bei Patienten mit diffuser Sklerodermie auf (> 70%) als bei Patienten mit der leichteren Form dieser Erkrankung.^{6,8}

Testprinzip

Bei dem von Ouchterlony⁹ beschriebenen Doppeldiffusionstest diffundiert eine Antigenlösung passiv durch eine Gelträgermatrix auf eine Patientenprobe und/oder eine den Antikörper enthaltende Positivkontrolle zu. Speziell geformte Vertiefungen in der Gelmatrix dienen als Depots, aus denen die Antigen- und Antikörperlösungen aufeinander zu diffundieren. Bei Erreichen des Antigen-/Antikörper-Äquivalenzpunktes bildet sich eine sichtbare Präzipitationsbande im Gel. Der immunologische Zustand eines Patienten kann dann durch den Vergleich der Präzipitationsbande einer Positivkontrolle mit bekannter Spezifität und eines unbekanntes Patientenserums bestimmt werden.

Die Doppeldiffusionsmethode kann mit einer gereinigten Scl-70-Aufbereitung, einer bekannten Scl-70-Autoantikörper-Positivkontrolle und einem Patientenserum, das vermutlich Scl-70 Antikörper enthält, verwendet werden, um die immunologische Identität oder Nichtidentität aufzuzeigen. Die Scl-70-Autoantikörperaktivität im Patientenserum wird bestätigt, wenn die Präzipitationsbande charakteristisch mit der durch eine bekannte Kontrollprobe geformte Bande zusammenfließt.

In bestimmten Fällen ist eine semi-quantitative Bestimmung der Menge von Scl-70-Autoantikörpern im Patientenserum wünschenswert. In solchen Fällen kann die NOVA Gel „T“ Platte zum Testen einer seriell verdünnten Patientenprobe eingesetzt werden. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, bei der sich eine Präzipitationsbande bildet, kann dann als Titer des Scl-70-Autoantikörpers im Patientenserum gewertet werden. Für das korrekte Doppeldiffusionstestverfahren ist die Durchführung des Tests mit mehreren Verhältnissen von Antigen-/Antikörperkonzentrationen notwendig, um einen Antigen- oder Antikörperüberschuss zu verhindern. Bei Antigen- oder Antikörperüberschuss besteht die Gefahr, dass falsche oder irreführende Präzipitationsbanden gebildet werden. Um dies zu verhindern, sollten Verdünnungen des Patientenserums gegen die gleiche Antigenkonzentration untersucht werden. Dies kann durch die Titrierung der Patientenprobe auf der NOVA Gel „T“-Platte erfolgen.

Inhalt der Testpackung

1. Nova Gel „T“ Titrierungsgelplatten mit je 7 Probendepots, enthalten Stabilisatoren und 0,09% Natriumazid
2. 0,4 ml Scl-70-Antigen (vom Kalbsthymus), lyophilisiert in einem Puffer mit Stabilisatoren und 0,09% Natriumazid
3. 1,4 ml Scl-70-Positivkontrolle, Humanserum mit Autoantikörpern gegen Scl-70 in einem Puffer mit 0,09% Natriumazid

Hinweise

1. Alle in diesem Test verwendeten Reagenzien humanen Ursprungs wurden im Vorfeld mit FDA-zugelassenen Methoden auf HIV, HbsAg (Hepatitis B) und HCV (Hepatitis C) getestet und für negativ befunden. Da allerdings keine Testmethode das Vorhandensein von HIV, HBV oder HCV vollständig ausschließen kann, sollten grundsätzlich alle Positivkontrollen wie potentiell infektiöses Material

- behandelt werden.¹⁰
2. Natriumazid (NaN_3) wird als Konservierungsmittel verwendet, ist giftig und kann bei Haut- oder Augenkontakt toxische Reaktionen verursachen. Bei der Entsorgung von NaN_3 über kupfer- oder bleihaltige Abwasserrohre kann es zur Bildung von explosiven Metallaziden kommen. Zur Vermeidung mit reichlich Wasser nachspülen.
 3. Während der Testdurchführung sollte auf eine adäquate Schutzausrüstung (z.B. Handschuhe, Kittel) geachtet werden.
 4. Ausgelaufene Flüssigkeiten sollten sofort aufgewischt werden. Bei der Entsorgung müssen Umwelt- und behördliche Richtlinien (national und regional) berücksichtigt werden.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieses Produkt darf nur für In Vitro Diagnostik benutzt werden.
2. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Es wird empfohlen, Antigen mit **sterilem destilliertem** oder **deionisiertem** Wasser zu rehydrieren.
4. Die Testqualität wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, u.a. durch die Temperatur des Reagenz, Verhinderung eines Überlaufens der Reagenzien oder Patientenproben aus den Probendepots und die Qualität des Wassers, das für die Rehydrierung des Antigens verwendet wird. Zur Erzielung präziser und reproduzierbarer Ergebnisse muss vor allem auf ein einheitliches, standardisiertes Verfahren geachtet werden.
5. Die strikte Einhaltung des Protokolls wird empfohlen.

Lagerung

Alle Kitreagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Haltbarkeit der Reagenzien bis zum ausgewiesenen Haltbarkeitsdatum ist gewährleistet, sofern die Reagenzien wie vorgeschrieben gelagert und behandelt werden. Nach der Rehydrierung ist das Antigen zwei Wochen bei 2-8°C haltbar. Falls gewünscht, können 100 µl Aliquots des Antigens hergestellt und bei $\leq -70^\circ\text{C}$ gelagert werden. Auf diese Weise gelagertes Antigen ist mindestens 1 Jahr haltbar.

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Werden Azide oder andere Stabilisatoren zu den Serumproben gegeben, können die Ergebnisse nachteilig beeinflusst werden. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitze einwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blutkuchen zu trennen. Das NCCLS Dokument H18-A2 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen, ist die Probe bei $\leq -20^\circ\text{C}$ einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testdurchführung sorgfältig gemischt werden.

Testdurchführung

In der Testpackung vorhandenes Material

- | | |
|---|---|
| 8 | Vorgestanzte NOVA Gel „T“ Titrierungsgelplatten |
| 2 | 0,4 ml Scl-70-Antigen, lyophilisiert |
| 1 | 1,4 ml Scl-70-Positivkontrolle |

Zusätzliches benötigtes Material

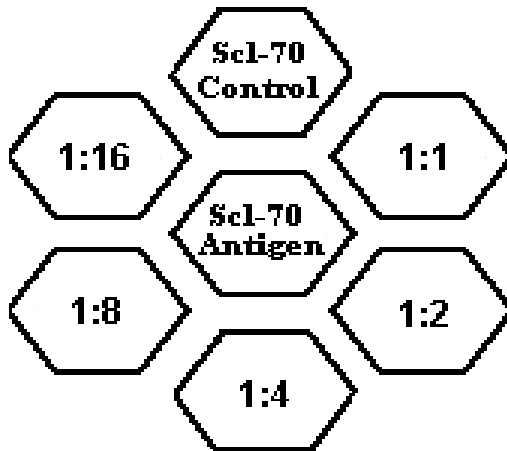
Mikropipetten zur Abgabe von 15-100 µl
Einmalspitzen für Mikropipetten
0,85% NaCl-Lösung
Destilliertes oder deionisiertes Wasser (vorzugsweise steril)
Lichtquelle oder Gel-Beleuchtungsbox

Methode

1. Rehydrierung des Scl-70-Antigens

Vorsichtig ein Antigenfläschchen öffnen und dem lyophilisierten Antigen 0,4 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben. Die besten Testergebnisse werden erzielt, wenn steriles destilliertes oder deionisiertes Wasser verwendet wird. Das rehydrierte Antigen 5 Minuten ruhen lassen und dann vor der Verwendung durch vorsichtiges Schwenken mischen.

2. Befüllen der Gelplatte



Eine Serienverdünnung (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) der Patientenprobe mit 0,85% NaCl-Lösung herstellen. Die Probendepots der Gelplatte wie dargestellt mit Antigen (ca. 80 µl), Positivkontrolle (ca. 80 µl) und Verdünnungen der Patientenprobe (ca. 80 µl) füllen. Die exakte Einhaltung der Füllmengen ist nicht nötig, DIE PROBENDEPOTS DÜRFEN ALLERDINGS NICHT ÜBERLAUFEN. Die Depots für die Positivkontrollen können direkt aus Kunststoffspritzflaschen oder mittels Mikropipetten befüllt werden. Bei Verwendung der Spritzflaschen die Spritzdüse der Flasche in das Depot halten und die Flasche langsam drücken, bis die Vertiefung bis nahe an den oberen Rand gefüllt ist. Die Platte sofort nach dem Füllen abdecken.

3. Inkubation

Die abgedeckte(n) Platte(n) auf einer stabilen ebenen Oberfläche bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubieren. Anschließend die Platte(n) darauf überprüfen, ob sich zwischen der Patientenprobe und dem Antigen Präzipitationsbanden gebildet haben. Dann die Beziehung dieser Bande(n) zur Präzipitationsbande der Positivkontrolle prüfen. Die Platte(n) nach 48 Stunden vor der endgültigen Interpretation der Ergebnisse erneut prüfen, um festzustellen, ob sich neue Banden gebildet haben.

Qualitätskontrolle

Die Scl-70-Positivkontrolle sollte auf jeder Platte mitgeführt werden. Damit kann überprüft werden, ob alle Reagenzien einwandfrei funktionierten und Arbeitsschritte richtig ausgeführt wurden. Weitere geeignete Kontrollseren können durch Aliquotieren von gepoolten Humanserumproben hergestellt und bei $\leq -70^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Testergebnisse können als gültige Resultate akzeptiert werden, wenn zwischen der Scl-70-Positivkontrolle und den Scl-70-Antigenvertiefungen eine Präzipitationsbande sichtbar ist.

Interpretation der Ergebnisse

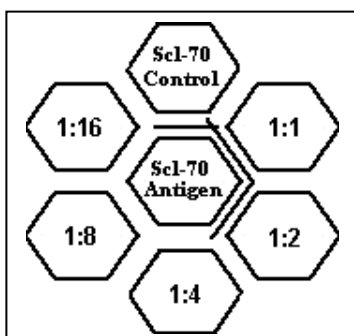
Zur optimalen Beurteilung der Präzipitationsbanden wird folgende Methode empfohlen:

1. Den Plattendeckel abnehmen.
2. Die Platte so halten, dass die Reflektion der Geloberfläche minimal ist.
3. Die Gelplatte von der Seite her beleuchten (d.h. parallel zur Geloberfläche). Hinweis: Darauf achten, dass die Lichtquelle abgeschirmt ist und nicht direkt in das Sichtfeld leuchtet.
4. Präzipitationsbanden sind am besten zu erkennen, wenn sie in einem Winkel gegen einen dunklen Hintergrund betrachtet werden.
5. Für schwache Linien oder zur Erkennung von Nichtidentitätsproben kann ein Vergrößerungsglas verwendet werden.

Negative Reaktion. Eine Probe ist negativ, wenn sich nach über 48 Stunden zwischen den Patientenprobendepots und dem Antigen depot keine sichtbare Präzipitationsbande gebildet hat.

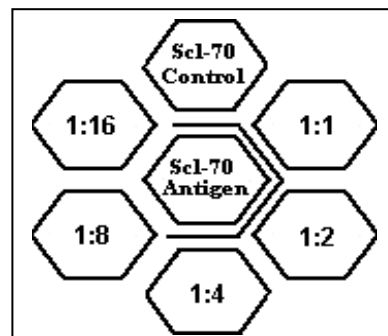
Interpretation der Spezifität. Bei der Doppeldiffusion wird die Spezifität durch Beurteilung der Relation zwischen den Präzipitationsbanden der Probe und der bekannten Positivkontrolle ermittelt. Folgende Möglichkeiten bestehen beim NOVA Gel™ Scl-70 Test:

Abb. 1: Nichtidentität



Die Präzipitationsbande des Patienten überkreuzt die Scl-70-Kontrollbande bzw. zeigt **Nichtidentität**. Das weist darauf hin, dass der Patient mit einem andern ENA-Antigen als Scl-70 reagiert.

Abb. 2: Scl-70-Identität



Die Präzipitationsbande des Patienten fließt mit der Scl-70-Kontrollbande zusammen und zeigt **Identität**. In diesem Fall hat der Patient Autoantikörper gegen Scl-70.

Grenzen des Verfahrens

1. Obwohl aufgrund der seriellen Probenverdünnung eher unwahrscheinlich, besteht doch die Möglichkeit eines Prozonephänomens. Dies geschieht, wenn im Verhältnis zum Antigen ein starker Überschuss an Patienten-Autoantikörpern vorhanden ist (Antikörperüberschuss) und sich eine Präzipitationsbande auf der Oberfläche des Antigendepots bildet. In solchen Fällen empfiehlt sich die Wiederholung des Tests mit den potenziell positiven Proben in höheren NaCl-Verdünnungen, um eine falsch negative Testinterpretation zu vermeiden.
2. Wenn nicht steriles oder kontaminiertes Wasser zum Rehydrieren des Antigens verwendet wird, kann sich das Antigen sofort oder allmählich zersetzen. In diesem Fall tritt nur eine sehr leichte oder überhaupt keine Präzipitationsbande auf.
3. Die ermittelten Testergebnisse sollten ausschließlich in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.
4. Der vorliegende Test wurde ausschließlich für die Untersuchung von Serum konzipiert.

Erwartungswerte

Mit dem NOVA Gel™ Scl-70 Doppeldiffusionstest wurden eine Vielzahl von Patienten mit Bindegewebserkrankungen und 200 randomisierte Blutspender getestet und die folgenden Ergebnisse ermittelt:

| Patientengruppe | Anzahl | Anzahl positiver NOVA Gel™ ENA-Tests Scl-70-positiv |
|-----------------------------|--------|--|
| SLE | 105 | 0 |
| Medikamentenbedingter Lupus | 24 | 0 |
| Rheumatoide Arthritis | 40 | 0 |
| Sklerodermie | 24 | 15 |
| Dermatomyositis | 14 | 0 |
| Sjögren's Syndrom | 14 | 0 |
| Normalwerte | 200 | 0 |

Referenzen

1. Tan E. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* **33**:167-239, 1982.
2. Tan E, et al. The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25**:1271-1277, 1982.
3. Casalo SP, Friou GJ, Myers LL. Significance of antibody to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **7**:379-390, 1964.
4. Catoggio LJ, et al. Serological Markers in progressive systemic sclerosis. *Clinical Correlations, Annals of the Rheumatic Diseases* **42**:23-27, 1983.
5. Takehara K, Moroi Y, Ishibasi Y. Antinuclear antibodies in the relatives of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* **112**:23, 1985.
6. Jarzabek-Chorzelska M, Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Kumar V, Beutner E. Scl-70 antibody-a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol* **115**:393-401, 1986.
7. Kumar V, et al. A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J Clin Lab Immunol* **15**:163-166, 1984.
8. Stein V, et al. Clinical Correlations and Prognosis Based on Serum Autoantibodies in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* **31**:2, 1988.
9. Ouchterlony O: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* **5**:1, 1958.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 1999 Fourth Edition (HHS Pub. # (CDC) 93-8395).

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America



Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service 888-545-9495
628475 December 2007
Revision DEU9