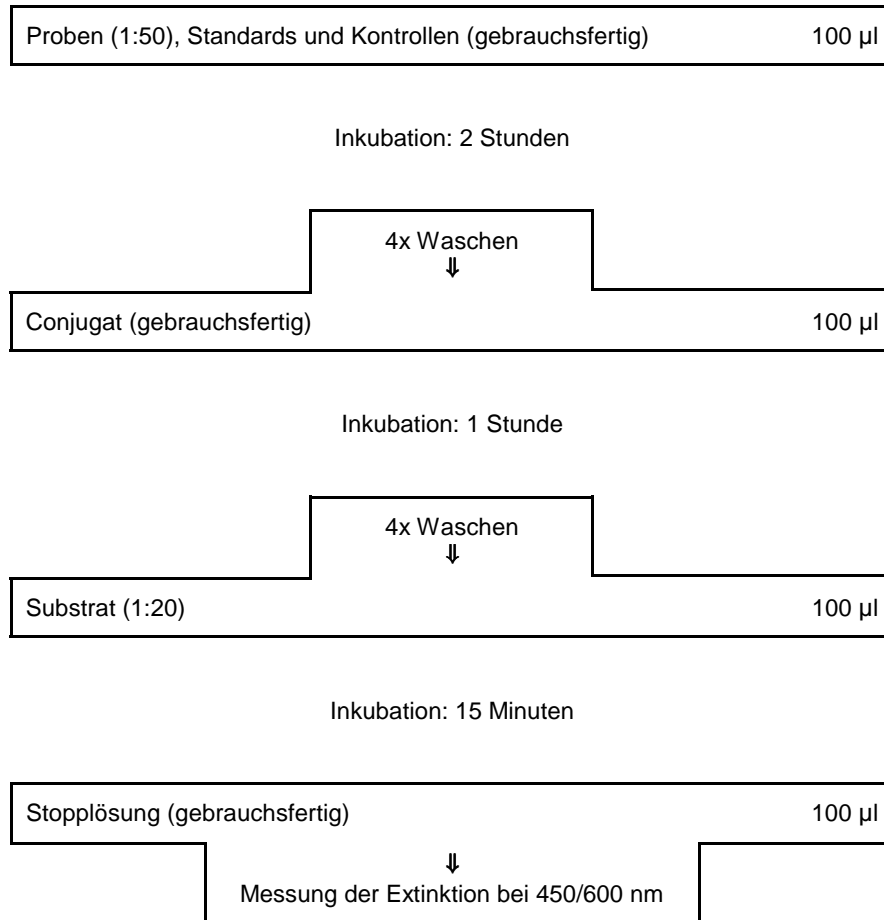


Schema des Testablaufs



Arbeitsanleitung

Anti-PR3 (C-ANCA) ELISA

**Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
Anti-Proteinase 3 Autoantikörpern
im Serum**

(in vitro Test)

Katalog-Nr. : EA004/96

Bestimmungen : 96

Lagerung : 2° - 8°C

HINTERGRUND UND ANWENDUNGSGEBIETE

Seit 1985 hat die Messung der anti-Neutrophilcytoplasma Antikörper (ANCA) Einzug in die Routinediagnostik gehalten (1-6, 16, 23). In der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) mit Ethanol-fixierten neutrophilen Granulozyten als Testsubstrat werden verschiedene Fluoreszenzmuster beobachtet. Autoantikörper die ein cytoplasmatisches Muster verursachen (C-ANCA), sind in der Regel gegen Proteinase 3 (PR3) gerichtet (8, 9).

Demgegenüber wird ein perinukleäres Fluoreszenzmuster (P-ANCA) durch eine Reihe verschiedener Autoantikörperspezifitäten verursacht. Während ursprünglich Myeloperoxidase (MPO) als Hauptzielantigen der P-ANCA beschrieben wurde (3, 4), zeigte sich später, daß nur ca. 10% der P-ANCA-Befunde auf Anti-MPO Antikörper zurückzuführen sind (12, 13). Neben Antikörpern gegen Elastase, Cathepsin G, Laktoferrin und Lysozym können auch Anti-Kern Antikörper (z.B. bei SLE) zu einer perinukleären Fluoreszenz führen. Die Messung von Anti-MPO Antikörpern, als Marker für die Mikroskopische Polyangiitis (17), ist deshalb nur mit einem Test wie dem Anti-MPO (P-ANCA) ELISA (Kat.-Nr.: EA005/96) möglich, bei dem hochgereinigte MPO als Antigen eingesetzt wird.

DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Anti-PR3 Antikörper (Anti-PR3) sind Marker für die Wegenersche Granulomatose (WG), kommen jedoch auch bei Patienten mit Mikroskopischer Polyangiitis vor (21). In einer Studie (7) mit 277 WG-Patienten und einem breitgefächerten und relevanten Kontrollkollektiv (1657 Patienten) wurde die hohe Spezifität des Anti-PR3 ELISAs von 98% für die Wegenersche Granulomatose gezeigt. Die Sensitivität des Tests war abhängig von der Krankheitsaktivität und Ausdehnung. Die Autoantikörper wurden bei 93% aller Patienten mit aktiv generalisierter Erkrankung, bei 60% aller Patienten mit aktiver locoregionaler Erkrankung und bei 40% aller Patienten in Remission gefunden. Verlaufsbeobachtungen zeigten, daß ein Anstieg der Krankheitsaktivität in der Regel mit einem Anstieg der Antikörperkonzentration einherging während bei Infektionen, wie sie bei den immunsupprimierten Patienten häufig sind, in der Regel kein Konzentrationsanstieg auftrat (7). In einer prospektiven Studie (10) über 16 Monate mit 35 WG-Patienten traten insgesamt 17 Rückfälle der Grunderkrankung auf. Bereits im Mittel sieben Wochen vorher wurde dieses Ereignis von einem Anstieg der Antikörperkonzentration angezeigt. Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden (24). Andere Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe deuten sogar darauf hin, daß durch eine Behandlung, die auf Veränderungen der Autoantikörpertiter basiert, Rückfälle der Wegenerschen Granulomatose verhindert werden können (11).

REFERENCES

1. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegeners granulomatosis. *Lancet* i:425-429, 1985.
2. Gross WL, Lüdemann G, Kiefer G, Lehmann H: Anticytoplasmic antibodies in Wegeners granulomatosis. *Lancet* i:806,1986.
3. Falk RJ, Jennette JC: Immunofluorescence and ELISA determination of ANCA with description of a sub-class with anti-myeloperoxidase activity. In: Rasmussen N, Wiik A (eds): Anti neutrophil cytoplasm antibodies. Proceedings of the 1st International Workshop on ANCA (Copenhagen, Denmark, 25-26 January 1988). *APMIS* 97(suppl 6), 1989.
4. Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318:1651-1657, 1988.
5. Andrassy K, Koderisch J, Waldherr R, Rufer M: Diagnostic significance of anticytoplasmic antibodies (ACPA/ ANCA) in detection of Wegeners granulomatosis and other forms of vasculitis. *Nephron* 49:257-258, 1988.
6. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohrbach MS, DeRemee RA: Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegeners granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64:28-36, 1989.
7. Nölle B, Specks U, Lüdemann J, Rohrbach MS, DeRemee RA, Gross WL: Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 111:28-40, 1989.
8. Lüdemann J, Csernok E, Ulmer M, Lemke H, Utecht B, Rautmann A, Gross WL: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis: immunodiagnostic value, monoclonal antibodies and characterisation of the target antigen. In: de Leeuw PW (ed): Proceedings of the 2nd International Workshop on antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) (Noordwijkerhout, The Netherlands, 23-24 May 1989). *Neth J Med* 36:157-162, 1990.
9. Lüdemann J, Utecht B, Gross WL: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastolytic enzyme. *J Exp Med* 171:357-362, 1990.
10. Kallenberg CGM: Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and vasculitis. *Clin Rheumatol* 9(suppl 1):132-135, 1990.
11. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hene RJ, Sluiter WJ, The TH, van der Hem GK, Kallenberg CGM: Prevention of relapses in Wegeners granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 336:709-711, 1990.
12. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, Limburg PC, van der Giessen M, Huitema MG, Koolen MI, Hene RJ, The TH, van der Hem GK, van dem Borne AEGKr, Kallenberg CGM: Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis Rheum* 33(8):1264-1272, 1990.
13. Ulmer M, Rautmann A, Gross WL: Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin Nephrol* 37(4):161-168, 1992.
14. Kallenberg CGM, Mulder AHL, Cohen Tervaert JW: Antineutrophil cytoplasmic antibodies: A still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med* 93:675-682, 1992.
15. Bini P, Gabay JE, Teitel A, Melchior M, ZHOU J, Elkon K: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Wegener's granulomatosis recognize conformational epitope(s) on proteinase 3. *J Immunol* 149(4):1409-1415, 1992.
16. Noël L-H et al.: ANCA: Diversity and clinical applications. *Advances Nephrol* 22:238-267, 1993.
17. Jennette JC et al.: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an International consensus conference. *Arthritis Rheum* 37(2):187-192, 1994.
18. Esnault VLM, Short AK, Audrain MAP, Jones SJ, Martin SJ, Skehel JM, Lockwood CM: Autoantibodies to lactoferrin and histone in systemic vasculitis identified by anti-myeloperoxidase solid phase assays. *Kidney International* 46:153-160, 1994.
19. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. Prevalence, specificities, and clinical significance. *Arthritis Rheum* 38(5):633-637, 1995.
20. Forde AM, Feighery C, Jackson J: Characterisation of anti-neutrophil cytoplasmic antibody target antigens using electrophoresis and Western blotting techniques. *British Journal of Biomedical Science* 55:247-252, 1998.
21. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jenette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage COS, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A: International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 111:507-513, 1999.
22. Gross WL, Trabandt A, Reinhold-Keller E: Diagnosis and evaluation of vasculitis. *Rheumatology* 39(3):245-252, 2000.
23. Wiik A: Relevant target antigens of ANCA in primary vasculitis: which test should be used in clinical practice? In: Walport MJ (ed): Proceedings of the 9th international ANCA workshop (Groningen, The Netherlands, 12-15 April 2000). *Clin Exp Immunol* 120 (suppl 1): 9-10, 2000.
24. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG, Limburg PC, Cohen Tervaert JW: Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 43 (9): 2025-2033, 2000.

BEWERTUNG

Proben mit Konzentrationen von **kleiner als 2,5 U/ml** sind als **negativ** für Anti-PR3 anzusehen.

Proben mit Konzentrationen **zwischen 2,5 und 5 U/ml** sind als **grenzwertig** anzusehen.

Proben mit Konzentrationen von **größer oder gleich 5 U/ml** sind als **positiv** für Anti-PR3 anzusehen.

Bei Resultaten im Grenzbereich bzw. bei negativen Resultaten und anhaltendem klinischen Verdacht können periodisch folgende Kontrollen Klärung schaffen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Beim Einsatz jedes Meßsystems für Autoantikörper ist zu bedenken, daß ein chemisch einheitliches Zielmolekül in diesem Fall nicht existiert. In den Patientenseren liegen Autoantikörpermischungen vor (Leichtketten, Subklassen, Allotypen, Epitopspezifitäten), die unabhängig von der Gesamtkonzentration von Individuum zu Individuum in ihrer Zusammensetzung und damit auch in ihrer Avidität schwanken. Gemeinsam ist ihnen nur die Bindungsfähigkeit an das Autoantigen, die aber individuelle Besonderheiten aufweisen kann. Dieser Umstand ist der Grund dafür, daß Patientenseren, die in einer Ausgangsverdünnung die gleiche Reaktionsstärke zeigen, sich in höheren Verdünnungen unterscheiden können. Trotz dieser Einschränkungen hat sich das in diesem Test eingesetzte Standardmaterial bei einer großen Anzahl von Seren für eine Quantifizierung als geeignet erwiesen. Wird für ein Serum ein vom Standardmaterial stark abweichendes Verdünnungsverhalten festgestellt, so kann es für die Verlaufskontrolle bei dem entsprechenden Patienten vorteilhaft sein, aus diesem Serum einen Patienten-spezifischen Standard herzustellen.

NÜTZLICHE HILFSMITTEL

Für die Probenverdünnungen haben sich 0,5 ml Gefäße, die im Mikrotiterplattenformat angeordnet werden können, bewährt (Bestell-Nr. 73.1055, Sarstedt, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht). In diesen Gefäßen kann man mit einer Multikanalpipette aus der Ausgangsverdünnung von 1:50 weitere Verdünnungen herstellen und auch direkt in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

Für das Pipettieren von Reagenzien mit der Multikanalpipette gibt es Reagenzienreservoirs (Bestell-Nr. 7782401, ICN Pharmaceuticals, Mühlgrabenstr. 12, 53334 Meckenheim).

TESTPRINZIP

Der Anti-PR3 (C-ANCA) ELISA ist ein Sandwich Enzym-Immunoassay. Während der Probeninkubation binden Anti-PR3 Antikörper aus den Patientenseren und Standards an hochreine Proteinase 3, die auf der Oberfläche von Mikrotitervertiefungen immobilisiert ist. Nach einem Waschschriff wird Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG zugesetzt, das an die Anti-PR3 Antikörper bindet. Nach einem weiteren Waschschriff setzt die gebundene Enzymmenge eine äquivalente Menge Tetramethylbenzidin (TMB) in dessen blaue Form um. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach Gelb. Die Extinktionen der Proben werden mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (Referenz 570-650 nm) gemessen und mit Hilfe der im Test eingesetzten Standardreihe in Konzentrationen umgerechnet. Da noch kein WHO-Standard für diese Autoantikörper existiert, wurden die Standardkonzentrationen 1987 frei definiert

Der Test kann auch als Suchtest genutzt werden, indem man nur die Standards S0 (Diluent für Proben) und S5 (5 U/ml Anti-PR3) einsetzt. Mit Hilfe dieser Standards werden die Grenzwerte festgelegt (siehe BEWERTUNG).

TESTBESTANDTEILE (in vitro Test)

PR3 : 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, die mit hochreiner Proteinase 3 beschichtet sind

dil : 2 Flaschen mit je 60 ml Diluent für Proben (enthält Phenol)

S5 : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Anti-PR3 Standard (human): 5 U/ml (enthält Phenol)

S20 : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Anti-PR3 Standard (human): 20 U/ml (enthält Phenol)

S50 : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Anti-PR3 Standard (human): 50 U/ml (enthält Phenol)

S100 : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Anti-PR3 Standard (human): 100 U/ml (enthält Phenol)

ø : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Negativ-Kontrolle (human) (enthält Phenol)

+ : 1 Röhrchen mit 0,75 ml Anti-PR3 Positiv-Kontrolle (human): 60 U/ml (enthält Phenol)

wash : 1 Flasche mit 50 ml 20fach konzentriertem Waschpuffer

conj : 1 Flasche mit 12 ml Anti-Human-IgG-POD-Conjugat (Kaninchen) (enthält Phenol)

subs : 1 Röhrchen mit 1,0 ml 20fach konzentrierter TMB-Substratlösung

stop : 1 Flasche mit 30 ml Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure)

Zusätzlich sind dem Testkit 2 Adhäsivfolien beigelegt. Eine Ausdrückhilfe für die Mikrotiterstreifen kann separat angefordert werden.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Der Kit muß bei 2° bis 8°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle Reagenzien müssen zum Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und (bis auf den Waschpuffer) sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden. Der Waschpuffer ist auch in Gebrauchsverdünnung bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

Die TMB-Substratlösung ist lichtempfindlich und sollte daher nicht länger als nötig dem Licht ausgesetzt werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Standard- und Kontrollmaterial sind humanen Ursprungs. Diese Materialien waren in unverdünnter Form in anerkannten Tests für Hepatitis B_e-Antigen und für HIV-Antikörper negativ. Trotzdem sind sie als potentiell infektiös anzusehen und mit der entsprechenden Sorgfalt und Vorsicht zu handhaben.

Die Stopplösung (verdünnte Schwefelsäure), die TMB-Substratlösung und Reagenzien, die Phenol enthalten, müssen mit Vorsicht gehandhabt werden, da sie Hautreizung verursachen können. Sie dürfen nicht verschluckt oder mit Haut oder Schleimhaut in Verbindung gebracht werden. Kommen Haut oder Schleimhaut doch in Kontakt mit diesen Reagenzien, so ist sofort mit viel Wasser zu spülen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Mikrotiterstreifen: Im geschlossenen Folienbeutel mindestens 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen und möglichst nahe am Rand aufschneiden. Da die Unterseiten der Vertiefungen nicht berührt werden dürfen, sollten die Mikrotiterstreifen mit der separat erhältlichen Ausdrückhilfe aus den Halterahmen gelöst werden. Bei Bedarf kann die benötigte Anzahl von Vertiefungen von den Streifen abgebrochen werden. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und den Druckleistenschluß vom Rand her zwischen zusammengedrückten Fingern hindurchziehen, da er nur so zuverlässig dichtet. Für die Bearbeitung weiterer Testkits sollte immer ein Halterahmen aufbewahrt werden, in den dann die jeweils benötigten Mikrotiterstreifen gesetzt werden können. Die für die Testdurchführung benötigten Streifen und Vertiefungen müssen fest in den Halterahmen gepreßt werden, damit sie beim Ausschlagen während des Waschens nicht herausfallen. Insbesondere wenn mit einem 8-Kanal-Waschgerät gearbeitet wird, sollten einige abgearbeitete Vertiefungen ausgespült und aufbewahrt werden. Sie können dann bei späteren Durchführungen in leere Positionen einer Spalte eingesetzt werden.

Waschpuffer: Den Inhalt der Flasche Waschpufferkonzentrat (50 ml) mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Eventuell vorhandene Ausfällungen sind konzentrationsbedingt; sie müssen in das Meßgefäß überführt und nach dem Auffüllen in Lösung gebracht werden. Der verdünnte Waschpuffer ist auch bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.

Substrat: Die TMB-Substratlösung (20fach Konzentrat) muß kurz vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:20 verdünnt werden, wobei jeweils nur das benötigte Volumen Gebrauchsverdünnung hergestellt werden darf. Wenn z.B. 2 Mikrotiterstreifen bearbeitet werden, sollten 2 ml Gebrauchsverdünnung angesetzt werden (1,9 ml dest. Wasser plus 0,1 ml TMB-Konzentrat).

Das TMB-Konzentrat und auch die Gebrauchsverdünnung sind lichtempfindlich und sollten daher nicht länger als nötig dem Licht ausgesetzt werden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

HINWEIS

Der Anti-PR3 (C-ANCA) ELISA ist auf gemeinsame Durchführung mit dem Anti-MPO (P-ANCA) ELISA (Kat.-Nr.: EA005/96) ausgelegt. Das bedeutet, daß für eine parallele Durchführung der Tests folgende Reagenzien aus dem einen oder dem anderen Kit gemeinsam benutzt werden können: Probenverdünnungspuffer, Negativ-Kontrolle, Waschpuffer, Conjugat, Substrat und Stopplösung. Es darf aber innerhalb einer Durchführung nur Conjugat oder Substrat aus einem der beiden Kits benutzt werden. Wird mehr Reagenz benötigt als in einem Kit noch vorhanden ist, so muß die benötigte Menge aus beiden Kits vor der Durchführung gemischt werden.

Die für den Anti-MPO (P-ANCA) ELISA spezifischen Testbestandteile (Mikrotiterstreifen, Standards und Positiv-Kontrolle) sind grün markiert bzw. mit grüner Deckelbeschriftung versehen.

VORBEREITUNG DER PROBEN

Werden die Patientenserum innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme getestet, genügt die Lagerung bei 2° bis 8°C; andernfalls müssen sie bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist durch Portionieren zu vermeiden.

Patientenserum 1:50 mit Diluent verdünnen (490 µl Diluent für Proben + 10 µl Serum). Sollte ein Serum mehr als 100 U/ml Anti-PR3 enthalten, so liegt es über dem Meßbereich und muß in Schritten von 1:20 (475 µl Diluent für Proben + 25 µl Vorverdünnung) weiterverdünnt werden bis der Extinktionswert in den Meßbereich fällt. Nach Erfahrung des Herstellers kommen Seren mit über 10.000 U/ml kaum vor und nur etwa 5 % aller positiven Seren enthalten Konzentrationen von über 2000 U/ml. Folglich fallen 95 % aller positiven Seren in den Meßbereich wenn 2 Serumverdünnungen getestet werden (1:50 und 1:1000).

TESTDURCHFÜHRUNG

Das Prozessvolumen beträgt 100 µl.

1. Probeninkubation: Die Mikrotitervertiefungen folgendermaßen befüllen (vorzugsweise als Doppelbestimmungen)

<u>gebrauchsfertige Kalibrationskomponenten</u>	<u>gebrauchsfertige Kontrollen</u>	<u>verdünnte Patientenserum (Proben)</u>
S0 (= Diluent für Proben)	ø Negativ-Kontrolle	
S5	+ Positiv-Kontrolle	
S20		
S50		
S100		

Mit Adhäsivfolie verschließen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

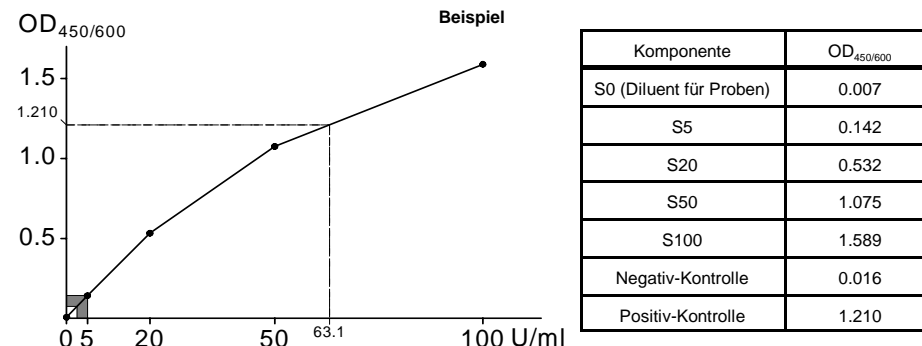
- Waschen: Vertiefungen entleeren und 4 Waschzyklen durchführen. Ein Zyklus besteht aus Befüllen der Vertiefungen mit 300 bis 350 µl Waschpuffer, Inkubieren für ca. 30 Sekunden und Entleeren. Nach dem letzten Zyklus müssen die Mikrotiterstreifen auf einem Papierhandtuch ausgeschlagen werden. Das Ausschlagen muß auch erfolgen, wenn ein Waschgerät verwendet wird.
- Conjugatinkubation: Jeweils 100 µl unverdünntes Conjugat in die Vertiefungen füllen, Streifen mit Adhäsivfolie verschließen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- Waschen: Wie unter Punkt 2 beschrieben.
- Substratreaktion: Jeweils 100 µl frisch angesetzte Substrat-Gebrauchsverdünnung in die Vertiefungen füllen und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- Stoppen der Substratreaktion: Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen füllen, dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substrat-Gebrauchsverdünnung.

MESSUNG

Platte sofort nach dem Abstoppen bei einer Meßwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm im Mikrotiterplattenphotometer gegen Luft messen. Steht kein 2-Kanal-Photometer zur Verfügung, kann auch ohne Referenzwellenlänge gemessen werden. Wenn für das Photometer ein Leerwert erforderlich ist, kann für diesen Zweck 200 µl/well Stopplösung benutzt werden. Kann die Messung erst später als 10 Minuten nach dem Abstoppen erfolgen, muß die Platte abgeklebt und lichtgeschützt gelagert werden. Bei Raumtemperatur ist dies bis zu 2 Stunden und bei 2°-8°C bis zu 24 Stunden möglich. Erfolgt die Lagerung bei 2°-8°C, darf erst nach Verdunstung des Kondenswassers gemessen werden.

AUSWERTUNG

Aus den Extinktionen der Proben werden mit Hilfe von Millimeterpapier oder einem Computerprogramm über lineare (Punkt-zu-Punkt) Interpolation oder eine geeigneten Kurvenanpassung die Konzentrationen (U/ml) der Proben ermittelt. Eventuelle Verdünnungen, die über die Ausgangsverdünnung von 1:50 hinaus gemacht wurden, sind dabei zu berücksichtigen, d.h. die ermittelten Konzentrationen müssen mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.



Durch lineare Interpolation wird aus der Standardkurve für die Positiv-Kontrolle eine Konzentration von 63.1 U/ml Anti-PR3 ermittelt.