

MASTAZYME™ Anti-ENA Combi 6

Enzymatická imunoesej pro kvalitativní screening autoantilátok proti SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 a Jo-1 v séru a plasmě

Návod k použití



Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME™ Anti-ENA Combi 6	733021	6 x 16 testů

Skladujte při 2 – 8 °C

MASTAZYME™ Anti-ENA Combi 6 – 2008-01-07

Obsah	Strana
1. Použití	3
2. Úvod	3
3. Princip testu	6
4. Součásti soupravy	6
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	7
6. Upozornění a zvláštní opatření	7
7. Uchovávání a trvanlivost reagensů	8
8. Odběr vzorku a manipulace	8
9. Pracovní postup	8
10. Výsledky a interpretace	9
11. Charakteristika testu	10
12. Literatura	11

1. Použití

Souprava MASTAZYME™ Anti-ENA Combi 6 je určena pro detekci specifických protilátek proti antigenům SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 a Jo-1 v séru a plasmě.

Tento test je určen pouze pro použití *in vitro*.

Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

2. Úvod

KLINICKÝ VÝZNAM

ENA autoprotiilátky („extrahovatelné nukleární antigeny“) jsou obecně považovány za podskupinu ANA autoprotiilátek („anti-nukleární protiilátky“). Extrahovatelné nukleární antigeny mohou být izolovány různými biochemickými metodami z jadra eukaryotických buněk a většina z nich je dobře charakterizována. Jejich klinický význam a jejich role v patogenezi jsou všeobecně uznávány, stejně jako skutečnost, že u mnohých chorob může být pomocí diagnostických metod detekováno více různých autoprotiilátek. Následující tabulka ukazuje soubor důležitých autoantigenů a jejich korelaci s možným nástupem či progresí různých onemocnění.

	SS-A (Ro)	SS-B (La)	Sm	Sm/RNP	Scl-70	Jo-1
Systémový lupus erythematosus (SLE)	< 30%	15%	> 30% (M)	> 35%		
Lupus Nephritis	> 50%	< 10%				
Léky vyvolaný lupus	> 30%					
Sjögrenův syndrom	> 40%	> 40%				
Neonatální SLE	> 30%					
ANA negativní SLE	> 60%					
MCTD / Sharp syndrom				> 85%		
Systémová skleróza	< 30%				> 65% (M)	
Polymyositida	10 - 30%					20 - 90% (M)

Autoantigeny označené „M“ jsou považovány za markery pro uvedené onemocnění

SS-A

Antigen

SS-A („solubilní substance A“) a takzvaný Ro protein (Robert) jsou identické antigeny. SS-A se skládá alespoň ze 4 krátkých RNA molekul a 2 proteinů o molekulové hmotnosti 60 kDa resp. 52 kDa. Ačkoliv SS-A a calreticulin – vápník vázající protein – vykazují jistou homologii, tak jsou oba proteiny od sebe jasně odlišitelné v jejich aminokyselinových sekvencích. Regulační proteiny jsou obvykle zachovány mezi zvířecími druhy, a proto se lidské autoprotiilátky lépe váží k SS-A proteinům nelidského původu. Anti-SS-A protiilátky se váží k několika doménám nativního proteinu o molekulové hmotnosti 60 kDa.

Klinický význam

Souvislost mezi SS-A autoprotiilátkami a lupusem nebo lupusu podobnými onemocněními je obecně přijímána a dobře popisována v odborné literatuře (1). Vysoké procento SS-A autoprotiilátek se nachází u skupiny pacientů trpících SLE postihujícím kůži a také u těhotných SLE pacientek s rizikem vzniku kongenitální srdeční zástavy u novorozenců. Expresse SS-A a zároveň i SS-B autoprotiilátek je ve většině případů známkou mírné progresse onemocnění. Někdy jsou přítomny pouze SS-A

autoprotilátky u pacientů trpících tzv. „ANA negativním“ a subakutním kožním lupusem. Koncentrace autoprotilátek anti-SS-A a anti-dsDNA dobře korelují s aktivitou onemocnění. Je prokázána vysoká incidence SS-A a SS-B autoprotilátek u Sjögrenova syndromu, u kterého tyto autoprotilátky dosahují vysokých titerů. Pouze u minimálního počtu pacientů, trpících sklerodermií a smíšeným onemocněním pojivové tkáně, dochází k expresi SS-A a SS-B autoprotilátek. Největší diagnostický a klinický význam mají pouze autoprotilátky třídy IgG, nicméně v sérech pacientů jsou detekovány i autoprotilátky tříd IgM a IgA.

SS-B

Antigen

SS-B („solubilní substance B“) a takzvaný La protein (Lane) jsou identické antigeny. Navzdory téměř identickým názvům a takřka totožným klinickým a diagnostickým funkcím SS-A a SS-B antigenů, není mezi nimi žádná homologie týkající se jejich biochemické a molekulární struktury. SS-B je definován jako fosfoprotein o molekulové hmotnosti 47 kDa, který je asociován s různými molekulami RNA jako např. rRNA a tRNA. RNA molekuly obvykle specifické pro SS-A proteiny se dokonce mohou vázat i k nativním SS-B. SS-B fosfoprotein je zahrnut do transportu RNA z buněčného jádra do cytoplasmy. Tento fosfoprotein je také součástí regulační kaskády ovlivňující reaktivitu RNA polymerázy III. ATPázová aktivita a schopnost rozpouštět DNA/RNA hybridní molekuly podporuje názor o fyziologických funkcích SS-B.

Klinický význam

Ve mnoha patientských sérech jsou často koexprimovány jak SS-A, tak i SS-B autoprotilátky. Oba typy autoprotilátek jsou přítomny výhradně u Sjögrenova syndromu na podkladě SLE. Až u 15% pacientů s SLE jsou přítomny SS-B autoprotilátky. U pacientů s SLE, kteří mají pozitivní SS-A a SS-B autoprotilátky se vyskytují mírnější příznaky onemocnění.

Izolované SS-B autoprotilátkové odpovědi se vztahují k časně formě Sjögrenova syndromu. SS-A a SS-B proteiny jsou exprimovány na srdečních svalových vláknech a mohou zvyšovat riziko vzniku kongenitální srdeční zástavy u novorozenců poté, co dojde k navázání příslušných autoprotilátek na tyto proteiny.

Sm a Sm/RNP

Antigen

Sm antigen (Smith) se skládá z 9 odlišných polypeptidů, které jsou společně s nRNP proteiny součástí jaderného sestřihového komplexu. Různé snRNA molekuly se váží k tomuto jadernému komplexu Sm proteinu za vzniku jasně definovaných proteinů B/B', D a E. Autoprotilátky, přítomné v séru pacientů, které jsou zaměřeny proti Sm antigenu, se váží především na proteiny B a D. Sm antigen přítomný na pevné fázi u soupravy MASTAZYME™ Anti-Sm obsahuje B a D proteiny, a dále Sm antigen neobsahuje žádné RNP!

Antigen Sm/RNP se skládá z různých snRNP molekul (malé jaderné ribonukleoproteinové částice), a také z Sm části. Částice snRNP a proteiny B/B', D, E, F nebo G, společně s molekulami mRNA, jsou součástí spliceosomu. Anti-RNP autoprotilátky se váží ke specifickým doménám Sm/RNP proteinového komplexu umístěného na pevné fázi, které jsou odlišné od domén, na které se váží anti-Sm autoprotilátky.

Klinický význam

Anti-Sm autoprotilátky jsou považovány za markery SLE onemocnění asociovaného s HLA DR4 a v několika málo případech jsou známkou MCTD onemocnění. Nicméně anti-Sm autoprotilátky jsou

vysoce prediktivní pro SLE. Třebaže „pouze“ u 35 % všech pacientů trpících SLE jsou anti-Sm autoprotiilátky exprimovány, jsou pozitivní výsledky (přítomnost anti-Sm autoprotiilátek) vysoce specifické pro SLE. Byla pozorována korelace mezi titrem těchto autoprotiilátek a aktivitou onemocnění, nicméně, klinický význam těchto poznatků je stále předmětem odborných diskusí.

Anti-snRNP autoprotiilátky jsou přítomny u SLE, ale jsou často přítomny také u MCTD. Pacienti, trpící revmatoidní artritidou, sklerodermií, Sjögrenovým syndromem a progresivní systémovou sklerózou, mohou být shledáni jako pozitivní na přítomnost anti-snRNP autoprotiilátek.

Scl-70

Antigen

Anti-Scl-70 autoprotiilátky se váží k eukaryotické topoizomeráze I (topo I), což je enzym lokalizovaný v jádře, kde se účastní změn terciární struktury genomové DNA během její replikace. V SDS-polyakrylamidovém gelu topo I migruje o velikosti 100 kDa, ale jsou zde přítomny i její menší fragmenty s proteolytickou aktivitou, jako je např. antigen Scl-70 o molekulové hmotnosti 70 kDa. Jako ostatní proteiny, zahrnuté do buněčné regulace topo I, je Scl-70 antigen vysoce konzervativní mezi různými živočišnými druhy, což vede ke zkříženým reaktivitám. Pro detekci anti-Scl-70 autoprotiilátek je nejdůležitější intaktní konformace antigenu.

Klinický význam

Anti-Scl-70 autoprotiilátky jsou detekovatelné u 20-30 % pacientů trpících sklerodermií. U těchto pacientů je přítomnost anti-Scl-70 autoprotiilátek považována za marker definující toto onemocnění. U těchto pacientů trpících sklerodermií s pozitivitou anti-Scl-70 autoprotiilátek, mohou být přítomna i další onemocnění, jako je SLE nebo Sjögrenův syndrom. Tato onemocnění je třeba vyloučit. Prevalence anti-Scl-70 autoprotiilátek je nízká mezi pacienty trpícími MCTD (smíšené onemocnění pojivové tkáně), ale dokonce i u těchto pacientů, je přítomnost anti-Scl-70 autoprotiilátek vysoce prediktivní pro toto onemocnění. Titry protiilátek obvykle nekorelují s aktivitou onemocnění (sklerodermie).

Jo-1

Antigen

Odpovídajícím antigenem pro anti-Jo-1 autoprotiilátky je histidyl-tRNA syntetáza. Enzym se nachází v prokaryotických a eukaryotických organismech, ale pouze antigeny, odvozené od vyšších eukaryontů nebo lidský antigen, jsou rozeznávány anti-Jo-1 autoprotiilátkami. Imunofluorescenční metody jasně ukazují distribuci antigenu v buňce, který je koncentrován v perinukleární cytoplazmě v závislosti na jeho fyziologické funkci, kterou je biosyntéza proteinů.

Klinický význam

Existuje silná korelace mezi anti-Jo-1 autoprotiilátkami a zánětlivými onemocněními svalů. Jo-1 je považován za diagnostický marker pro myositidu. Okolo 54 % Jo-1 pozitivit je přítomno u pacientů trpících primární myositidou, 40 % je spojováno s dermatomyositidou a 6 % Jo-1 pozitivních pacientů trpí myositidou společně s jiným onemocněním pojivové tkáně. Multisystémové poruchy, definované přítomností Jo-1, mohou být odděleny od ostatních symptomů, spojených s anti-syntetázovým syndromem.

3. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

3.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrům, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

3.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský-IgG konjugát s křenuvou peroxidázou je přidán do každé jamky. Konjugát se váže k protilátkám IgG (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich“. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrům.

3.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zabarvení je zastavena po 15-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 1 M H₂SO₄ do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlutou.

3.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm). Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.

4. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagensů pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační destičky a roztoky musí být skladovány při teplotě 2 – 8 °C. Datum expirace je uvedeno na štítku.

6 x 2	Mikrotitrační stripy	jednotlivé stripy obsahují 8 odlamovatelných jamek s navázaným konkrétním antigenem: SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70 a Jo-1
1 x	Držák	
6 x 1,5 mL	Cut-off kalibrátor	lidská poolová plazma s obsahem protilátek proti všem výše jmenovaným antigenům, naředěná v pufru, připravena k použití
6 x 1,5 mL	Pozitivní kontrola	lidská plazma s obsahem protilátek proti všem výše jmenovaným antigenům, naředěná v pufru, připravena k použití
1 x 1,5 mL	Negativní kontrola	lidská plazma bez přítomnosti výše uvedených protilátek, naředěná v pufru, připravena k použití
2 x 60 mL	Roztok k ředění vzorků	roztok PBS s obsahem konzervantu, připraven k použití

1 x 12 mL	Roztok konjugátu	roztok křenovou peroxidázou značené kozí anti-lidské IgG protilátky, připraven k použití
1 x 12 mL	TMB substrát	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, připraven k použití
1 x 12 mL	Stop roztok	1 M kyselina sírová, připraven k použití
2 x 50 mL	Promývací pufr	roztok PBS/Tween pufrů 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát může být zahřát až do 37 ° C po dobu 15 min. k zabránění vzniku krystalů

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufrы této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagensy musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagensy vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 ° C).
- Před použitím je nutné reagensy důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagensy ve stejných intervalech.
- Před použitím reagensů se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagensů. Protože jsou reagensy často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.

- Není možné míchat či jinak používat reagentie ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagentie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readerů).
- Vyhněte se kontaktu určitých reagentií, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

7. Uchovávání a trvanlivost reagentií

Všechny reagentie skladujte při teplotě 2 – 8 °C.

Datum expirace každé reagentie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagentie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 2– 8 °C. Po otevření by měla být souprava spotřebována do 3 měsíců.

8. Odběr vzorku

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Sérum je po vysrážení centrifugací odděleno od krve, která byla asepticky odebrána venepunkcí. Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 2 – 8 °C po dobu max. 3 dnů. Po delší dobu mohou být vzorky skladovány při teplotě -20 °C. Po rozmrazení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledků.

Pacientská séra musí být před testováním předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µL séra + 500 µL sérum diluentu).

9. Pracovní postup

9.1 Příprava reagentií

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu (18 – 24 °C), reagentie jemně promíchejte.

Promývací pufr: Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37 °C, a poté jemně promíchejte.

Naředte koncentrovaný promývací pufr v poměru 1:10 destilovanou vodou (např. 50 mL koncentrovaného pufru + 450 mL destilované vody). Důkladně promíchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle příložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagentie a vzorky musí být před použitím při pokojové teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.

- Nepoužité mikrotitrační destičky vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 2 – 8 °C.

9.2 Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních destičkách pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37 °C místo pokojové teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte 100 µL naředěného vzorku (1:101), cut-off kalibrátoru a kontrol do příslušných jamek. CO znamená antigen specifická cut-off kontrola, resp. pozitivní kontrola.
2. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte 100 µL roztoku HRP konjugátu do každé jamky.
5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30-ti minut.
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a 3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru. Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitrační destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte 100 µL TMB substrátu do každé jamky.
8. Inkubujte po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
9. Přidejte 100 µL stop roztoku do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek změřte optickou hustotu při 450 nm a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm.

Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 30 minut. Měřte optické hustoty během této doby.

10. Výsledky a interpretace

Kvalitativní hodnocení

Vypočítané hodnoty OD pro séra pacientů jsou porovnávány s hodnotami cut-off kalibrátoru (25 U/mL). Jestliže je hodnota vzorku vyšší, pak je vzorek považován za pozitivní.

Normální rozsah:

Negativní: OD vzorku < OD cut-off kalibrátoru

Pozitivní: OD vzorku > OD cut-off kalibrátoru

Interpretace výsledků

Pro určení diagnózy nelze využít pouze jednoho laboratorního výsledku. Výsledky by měly být interpretovány společně s ostatními laboratorními parametry a dalšími klinickými nálezy.

SS-A

Autoprotilátky zaměřené proti nativním SS-A 60 kDa a 52 kDa proteinům poskytují pozitivní výsledek. Kinetické změny u těchto protilátek obvykle nejsou fyziologicky důležité tak, jako pokles jejich titerů, který může být způsoben léčbou cytostatiky.

Po navázání si antigen (protein) zachovává svoji nativní konformační strukturu, která je zásadní pro specifickou vazbu autoprotilátky. Imunoblotové techniky nemusí být nutně schopny konfirmovat ELISA pozitivní výsledky.

SS-B

Souprava MASTAZYME™ SS-B detekuje autoprotilátky zaměřené proti nativnímu SS-B proteinu stejně tak, jako proti degradačním produktům o molekulové hmotnosti 23 a 29 kDa. Anti-SS-B pozitivní séra, u kterých zcela chybí anti SS-A autoprotilátky, jsou velmi vzácná.

Sm

Pozitivní výsledek je způsoben přítomností autoprotilátek zaměřených proti Sm jadernému sestřihovému komplexu obsahujícímu specifické antigeny B'/B, D, E, F a G. Antigen navázaný na pevnou fázi je bez RNP proteinu!

Sm/RNP

Sm/RNP detekuje autoprotilátky zaměřené proti regulačně nebo metabolicky funkčním ribonukleovým částicím. Antigen váže také autoprotilátky proti jadernému Sm. Pozitivní výsledky jsou vysoce prediktivní pro SLE nebo MCTD.

Scl-70

Pozitivní výsledky jsou vysoce prediktivní pro sklerodermii. Pouze u minima pacientů s SLE a Sjögrenovým syndromem je přítomna pozitivita anti Scl-70 autoprotilátek. U zdravých dárců krve se jen výjimečně vyskytuje pozitivita anti Scl-70 autoprotilátek při využití metodiky Scl-70 ELISA. Hodnoty titerů anti Scl-70 autoprotilátek by neměly sloužit jako kritérium pro posuzování aktivity a prognózy onemocnění.

Jo-1

Na MASTAZYME™ Jo-1 pevné fázi je navázán vysoce purifikovaný izolát aminoacyl-tRNA-histidylsyntetázy, který je velmi selektivní pro anti-Jo-1 autoprotilátky. Díky tomu je téměř vyloučena možnost zkřížené reaktivity!

11. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testů MASTAZYME™ Anti-ENA Combi 6 byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

12. Literatura

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).