

Instructions for Use

EULISA Scl-70 IgG

Intended Use

Enzyme immunoassay for the detection of
autoantibodies IgG against Scl-70

Micro titration 96 wells
Store kit at +2-8°C
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0219-02

March, 2015

EULISA Scl-70 IgG

English: page 1
Deutsch: Seite 20

REF 213196

IVD



96

Contents

1. Introduction and background
2. Warnings and precautions
3. Principle of the test
4. Contents of the kit
5. Materials required but not supplied
6. Storage of the kit
7. Reagent and sample preparation / specimen requirements
8. Assay procedure
 - 8.1. Manual operation
 - 8.2. Dynex DS2 automated ELISA system
9. Evaluation and quality control
10. Interpretation of results / limitations of the procedure
11. Performance characteristics
 - 11.1. Standardisation
 - 11.2. Analytical specificity
 - 11.3. Detection limit (analytical sensitivity)
 - 11.4. Homogeneity of the solid phase
 - 11.5. Linearity
 - 11.6. Precision
 - 11.7. Frequency distribution of Scl-70-Ab (IgG)
 - 11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system
12. Warranty
13. Symbols
14. References
15. Summary flow chart

The product described herein has been manufactured in compliance with IVD directive 98/79/EG.

1. Introduction and background

Progressive Systemic Sclerosis (PSS, scleroderma) is a chronic-inflammatory, autoimmune mediated disorder of the connective tissue. Its main manifestation is a thickening and hardening of the skin, but inner organs and blood vessels can be affected as well.

PSS patients present characteristic autoantibodies against a variety of nuclear proteins but almost always only one specificity at a time. These antibodies are valuable indicators of different PSS subsets and overlap syndromes with other systemic inflammatory disorders (1). Depending on the PSS variant, 20 - 60 % of patients carry antibodies directed against a basic nonhistone protein referred to as Scl-70 (scleroderma-associated 70 kDa autoantigen) (2). It has been identified as DNA-topoisomerase I (3), a key nuclear enzyme that interconverts supercoiled DNA to the topological conformation required for DNA replication and transcription.

Scl-70 autoantibodies are considered as reliable marker of PSS with a specificity > 90 % (4). They indicate its severe course (diffuse scleroderma), typically involving lung, kidney or heart. In contrast, patients with the CREST syndrome, the limited, cutaneous form of PSS, rarely carry Scl-70 autoantibodies (5).

The present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) is intended for the quantitative or qualitative determination of IgG antibodies in human serum, directed against Scl-70. The antigen used is a highly purified preparation of recombinant human DNA-topoisomerase I, expressed in the baculovirus system. The test is fast (incubation time 30 - 30 - 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). Six calibrators allow quantitative measurements; a negative and a positive control check the assay performance.

2. Warnings and precautions

The test kit is intended for in vitro diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Adherence to the protocol is strongly recommended.

The sample buffer, calibrators and controls contain Na-azide as preservative. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate

contains 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The stop solution, 0,2 M sulfuric acid (H₂SO₄), is acidic and corrosive.

The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.

Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.

The calibrators and controls contain components of human origin. They have produced negative results when tested for Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag, HIV 1/2-Ab and hepatitis C Virus (HCV)-Ab, in FDA-approved or European Directive 98/79/EG-compliant tests. However, no known test can guarantee that products derived from human blood will not be infectious. They should therefore be handled as if capable of transmitting infectious agents, and discarded appropriately. Please refer to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local/national guidelines on laboratory safety and decontamination procedures. Safety data sheet for all hazardous components contained in this kit is available on request from Euro Diagnostica.

3. Principle of the test

The wells of the solid phase are coated with Scl-70. On this surface, the following immunological reactions take place:

1st reaction: Scl-70-specific antibodies present in the sample bind to the immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.

2nd reaction: A second antibody, directed at human IgG antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.

3rd reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development reflects the concentration of Scl-70 antibodies (IgG) in the sample.

4. Contents of the kit

- a. 1 microwell plate, coated with Scl-70 and hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, each of which can be broken into 8 individual wells.

MWP	12x8
------------	-------------

- b. Sample buffer, 100 mL, ready-to-use, orange coloured. Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and Na-azide.

BUF	SPL
------------	------------

- c. Wash buffer, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured. Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

- d. 6 calibrators, 2,0 mL each, 0 - 0,60 – 2,0 – 6,0 - 20 and 60 U Scl-70 antibodies (IgG) / mL, ready-to-use, gradually blue coloured. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CAL	1-6
------------	------------

- e. Negative and positive control, 2,0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CONTROL	-
----------------	----------

CONTROL	+
----------------	----------

- f. Anti-human IgG HRP conjugate, 14 mL, ready-to-use, red coloured. Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.

CONJ	IgG
-------------	------------

- g. Substrate solution, 14 mL, ready-to-use, colourless. Contains a buffered solution of TMB and H₂O₂. Contained in a vial impermeable to light.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stop solution (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, colourless, ready-to-use. Caution: sulfuric acid is corrosive.



- i. Directions for use
- j. Lot-specific certificate of analysis

5. Materials required but not supplied

- a. Deionised or distilled water
- b. Graduated cylinder, 1000 mL
- c. Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
- d. Pipettes for 10, 100 and 1000 µL (1- and 8-channel pipettes recommended)
- e. Microwell plate washer (optional)
- f. Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
- g. ELISA evaluation program (recommended)

6. Storage of the kit

Store kit at 2 - 8°C. It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

7. Reagent and sample preparation / specimen requirements

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions.

- a. Before opening the pouch of the solid phase, it must have reached room temperature. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.

- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 - 8°C).
- c. Preparation of the samples: Handle patient specimens as if capable of transmitting infectious agents. Prepare sera using normal laboratory techniques and dilute them 1/100, e.g. 10 µL serum + 990 µL sample buffer. Mix thoroughly.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the calibrators, controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 - 8°C and assayed within 3 days. For longer storage, -20°C or lower temperature are recommended. Repeated freezing and thawing of sera should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

Specimen requirements: Highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated sera may cause erroneous results and should be avoided.

8. Assay procedure

8.1. Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 ± 3°C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- a. Immediately prior to use, wash the solid phase once: fill wells with 350 µL wash buffer each, soak for about 10 seconds in the wells and remove.
- b. Dispense the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue), controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and the diluted samples rapidly into the microwells; 100 µL per well. Duplicate measurements are recommended.

Incubate the plate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

- c. Wash the wells 4 times as in step a.
- d. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the conjugate (14 mL, ready-to-use, red); 100 μL per well. Incubate the plate as in step b.
- e. Repeat wash step c.
- f. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the substrate solution (14 mL, ready-to-use, colourless, black vial); 100 μL per well. Incubate the plate as in step b. As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.
- g. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless. Caution: corrosive!); 100 μL per well. Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- h. Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

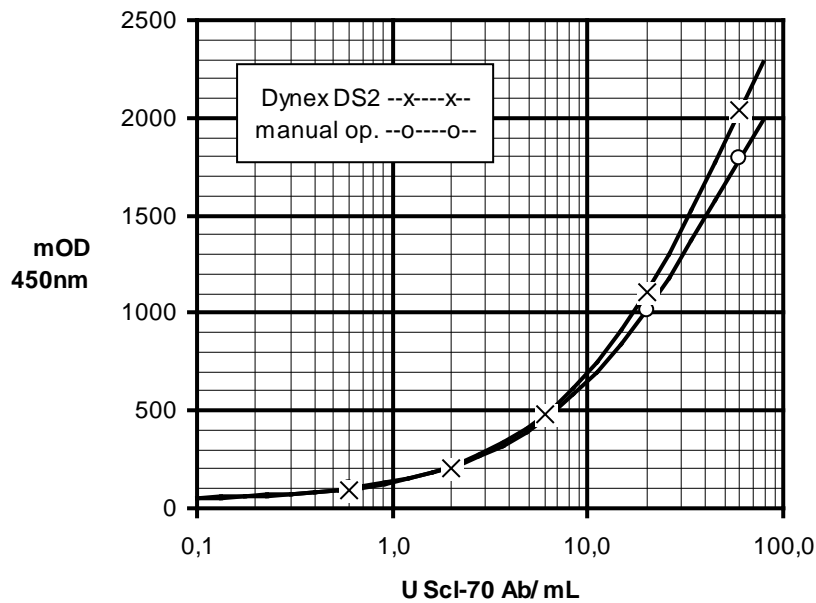
Store the remainder of the reagents refrigerated ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) if they are to be used again.

8.2. Dynex DS2 automated ELISA system

This product has been validated for use with the Dynex DS2 automated ELISA system. A suitable program file for assay execution and evaluation is available on request. The parameters of this program are merely a proposal and may need to be adapted by the operator to the requirements of the actual assay. In general terms, we have attempted to stick as close as possible to the protocol of manual operation, as above. However, due to the necessarily elevated temperature within the DS2, the substrate incubation period had to be shortened. Article 11.8. gives a performance comparison between manual assay operation and the DS2 ELISA system.

9. Evaluation and quality control

Quantitative evaluation: The data obtained are quantitatively evaluated with the standard curve, as shown below. However, the depicted curve can only serve as a model. It can not substitute the measurement of the calibrators, together with the controls and actual samples. The curve has been constructed with a conventional ELISA evaluation program, using a 4-parameter function. The Spline approximation is also appropriate.



1411FE00.FED/StdKurveV1412J

If no computer-supported evaluation is possible, the standard curve may be drawn by hand. It allows transformation of the absorbance value of a sample into its concentration, i.e. into U Scl-70 antibodies (IgG) per mL serum.

Qualitative evaluation: The test may also be evaluated in a qualitative manner. This requires measurement of the positive control only. Nevertheless, measurement and examination of the negative control is recommended (see below: quality control).

In qualitative test evaluation, the absorbance of the samples is compared with the borderline absorbance (= cut-off). It is determined according to the following formula:

$$\text{absorbanceborderline} = \text{absorbancepositive control} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis which is included with each test kit. Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{positive control}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0,35 \\ \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of how positive a particular sample is for Scl-70 Ab (IgG), one may calculate the ratio, according to the formula:

$$\text{ratio} = \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{borderline}}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance}_{\text{sample}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Quality control: The positive and negative control check the assay performance. Their authorised values and acceptable ranges, respectively, are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls have to fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

10. Interpretation of results / limitations of the procedure

Based on the measurement of a blood donor and a positive collective of sera (see below), we suggest for the assessment of patient sera:

	quantitative evaluation U Scl-70 Ab (IgG) per mL serum	qualitative evaluation ratio
normal (negative) range	< 3,2	< 0,85
cut-off	4,0	1,00
equivocal range	3,2 - 5,0	0,85 - 1,17
positive range	> 5,0	> 1,17

These specifications are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A negative test result indicates that the patient does not have an elevated level of IgG antibodies to Scl-70. Hence, the severe course of PSS is rather unlikely

but not ruled out. If the CREST syndrome is suspected, autoantibodies directed at centromere protein B (CENP-B) should be determined.

Due to the high diagnostic specificity of Scl-70 antibodies, a positive result should be interpreted as indication of PSS.

Specimens exhibiting results between the borderlines quoted above should be considered as equivocal and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

11. Performance characteristics

11.1. Standardisation

The test is standardised with a purified serum preparation containing IgG antibodies specifically directed at Scl-70. This preparation has been calibrated against a set of gradually positive sera, solely reserved for this purpose. The degree of sample reactivity is measured in arbitrary units (U/mL) since no international standard is available.

11.2. Analytical specificity

The test permits the specific determination of human IgG antibodies directed against Scl-70. It has been validated (among other parameters) by means of the commercially available human reference sera of the CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA). The following results are typical:

serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC- result	ds- DNA	SS-B /La	--	U1- RNP	Sm	--	SS-A /Ro	--	Scl- 70	Jo- 1
immune- fluorescence	homo- gen/ rim	speck- led	speck- led	--	--	nuc- leolar	--	centro- mere	--	--
ELISA (U/mL)	0,9	0,4	0,5	0,5	1,2	3,3	0,5	0,4	>60	0,3

11.3. Detection limit (analytical sensitivity)

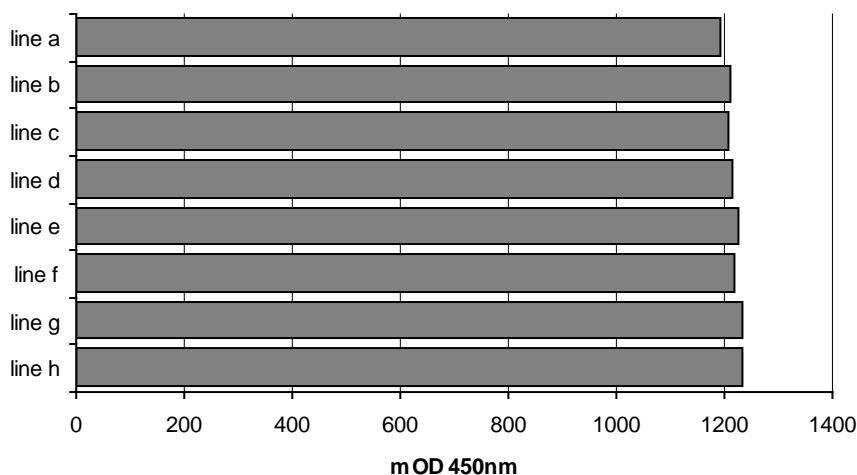
The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as < 0,2 U Scl-70 Ab (IgG) per mL serum (n = 24).

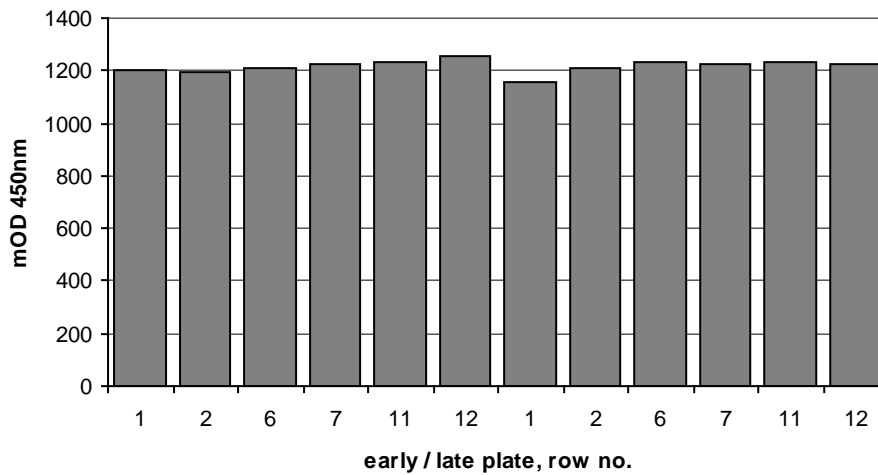
Recommended measuring range: 0,5 - 60 U/mL

11.4. Homogeneity of the solid phase

Measurement of the solid phase homogeneity is regular QC part of each production lot. This is determined by 288-fold measurement of a IgG-positive but non-saturating sample on 3 selected plates. Acceptance criterion: mOD-coefficient of variation (cv) over the plates < 8%. The figure below shows a representative excerpt (solid phase lot no. 0702E) of such an analysis.

plate	early (n/10)						late (9n/10)						mean	cv%
row	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
line a	1144	1186	1201	1186	1250	1243	1142	1169	1201	1189	1201	1211	1194	2,8
line b	1211	1163	1204	1197	1206	1258	1125	1222	1238	1236	1230	1226	1210	3,0
line c	1218	1173	1196	1212	1181	1234	1155	1217	1265	1243	1219	1189	1209	2,6
line d	1198	1178	1205	1242	1223	1269	1154	1215	1233	1225	1228	1229	1217	2,5
line e	1216	1199	1225	1250	1271	1261	1187	1195	1228	1224	1244	1232	1228	2,1
line f	1223	1216	1197	1242	1198	1244	1136	1209	1244	1216	1241	1245	1218	2,6
line g	1205	1232	1239	1209	1276	1287	1157	1205	1233	1238	1246	1263	1233	2,9
line h	1198	1228	1207	1262	1273	1270	1206	1226	1241	1219	1266	1193	1232	2,4
mean	1202	1197	1209	1225	1235	1258	1158	1207	1235	1224	1234	1224	1217	
cv%	2,1	2,2	1,2	2,2	3,0	1,4	2,3	1,5	1,4	1,4	1,6	2,1		2,7

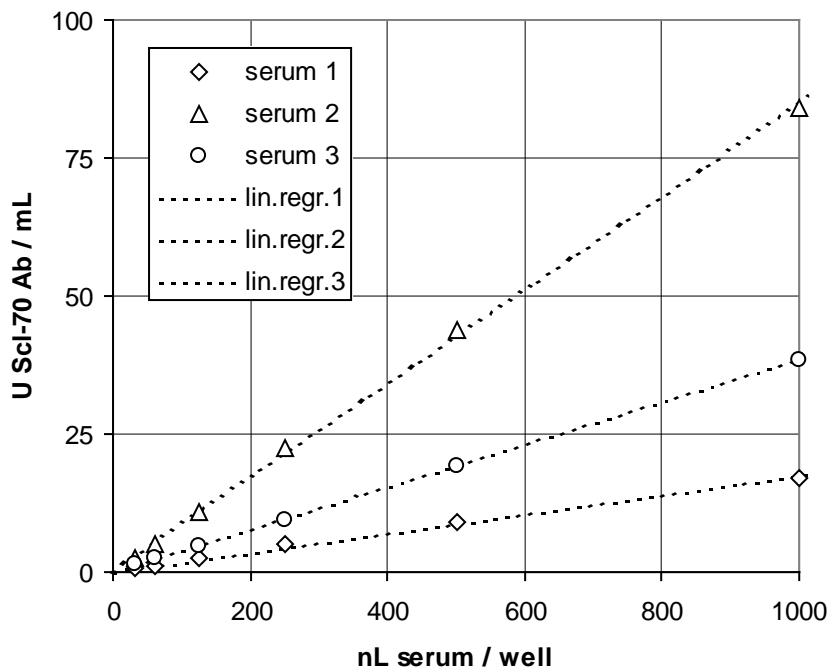




1411FE00.FED/FphHomV1412J

11.5. Linearity

In order to assess the dose-response relationship of the test, positive sera were measured in serial 2-fold dilution. Acceptance criterion: linear regression of 4 successive dilutions must yield a correlation factor > 0,98. A typical result is depicted below.



1411FE00.FED/LinearV1412J

11.6. Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined: a. within 1 assay and between 3 assays, b. between 3 operators and c. between 2 kit lots.

a. Intra- and inter-assay variability (n = 24 and 72, respectively)

sample	mean U/mL	variability (cv, %) intra-assay	inter-assay
1	7,0	3,5	4,7
2	14	8,0	10,0
3	26	2,6	9,0

b. Operator to operator variability (n = 12)

sample	mean U/mL	variability (cv, %)
1	7,6	2,0
2	15	7,8
3	31	2,8

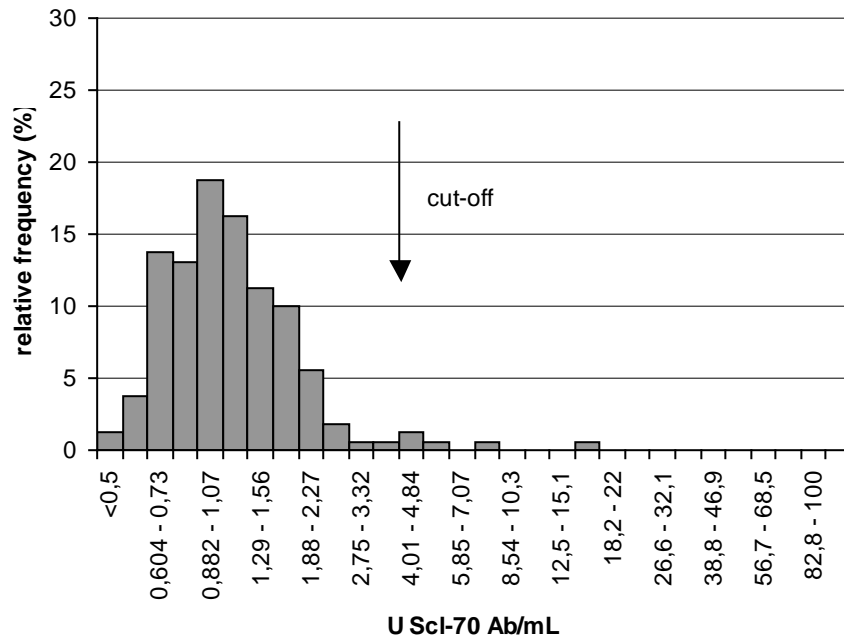
c. Variability between 2 kit lots (n = 6)

sample	mean U/mL	variability (cv, %)
1	7,6	2,9
2	15	4,5
3	31	2,4

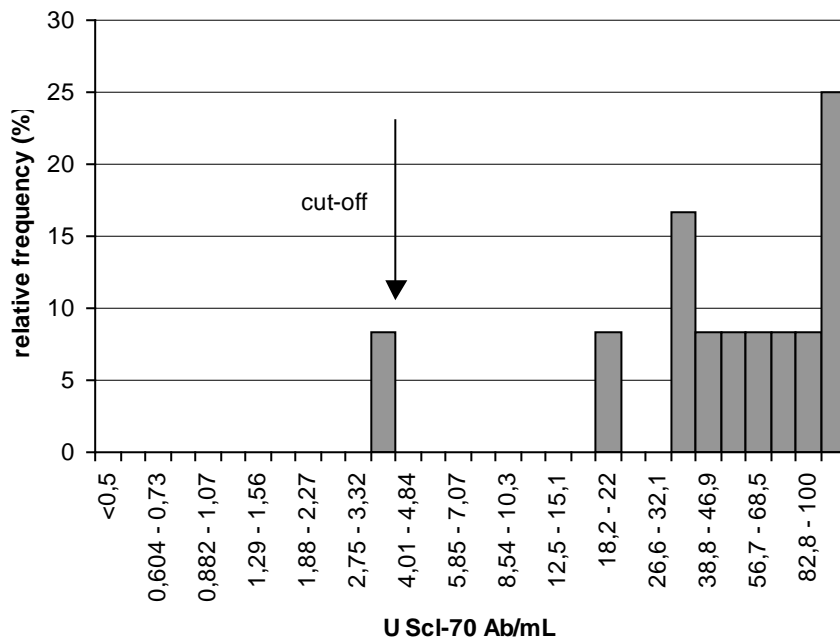
11.7. Frequency distribution of Scl-70 Ab (IgG)

This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of sera which had been found positive for Scl-70 Ab (IgG) according to a CE-compliant reference ELISA or were clinically defined. The following distribution of the analyte was observed:

blood donor sera



positive sera



1411FE00.FED/HäufigPlotV1412J

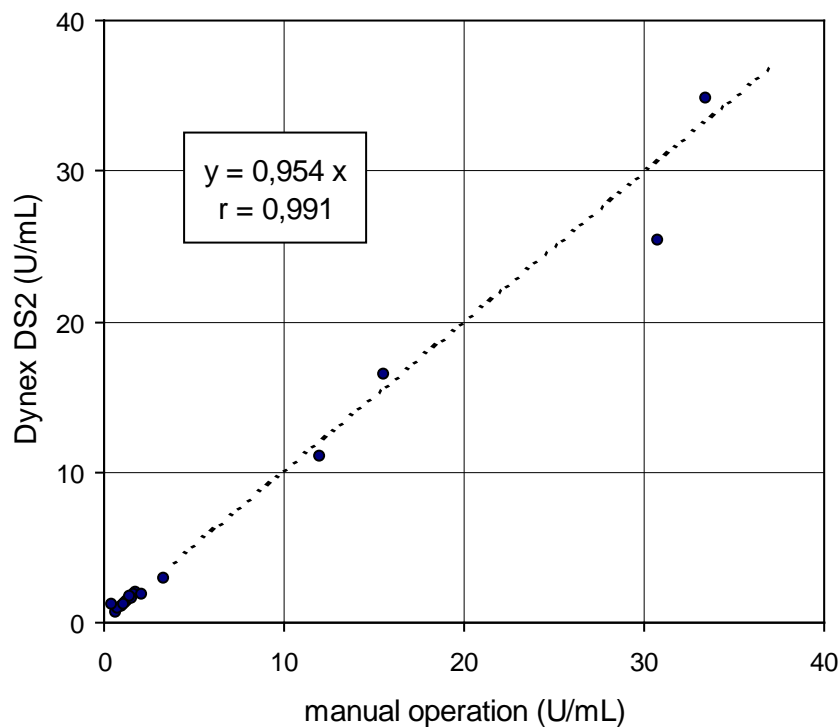
blood donor sera		positive sera	
n:	160	n:	12
mean:	1,4 U/mL	mean:	79 U/mL
mean + s:	2,8 U/mL	mean - s:	15 U/mL
mean + 2s:	4,3 U/mL	mean - 2s:	< 0 U/mL
median:	1,1 U/mL	median:	60 U/mL
95 th percentile:	2,4 U/mL	5 th percentile:	13 U/mL

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off as 4,0 U/mL (6). The data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of about 97 % and nearly 100 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.

11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

Standard curve: depicted in article 9

Correlation:



1411FE00.FED/KorrDynexDS2-V1412J

Variability: Using specimen of one and the same kit lot, the variability of assay results were compared between manual operation and the Dynex DS2 automated ELISA system:

	manual operation	Dynex DS2
intra-assay variability (n = 16)	mean cv = 3,3 %	mean cv = 4,9 %
inter-assay variability (n = 48)	mean cv = 5,4 %	mean cv = 7,2 %

12. Warranty

Euro Diagnostica AB guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given.

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case Euro Diagnostica AB disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, Euro Diagnostica AB accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

13. Symbols



Catalogue number



Batch code



Contains sufficient for $\langle n \rangle$ tests



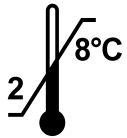
In vitro diagnostic medical device



Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive



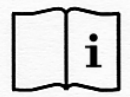
Keep away from sunlight



Temperature limit



Use-by date



Consult Instructions for use



Biological risks



Manufacturer

14. References

1. Mierau, R., Genth, E.: Autoantikörper bei systemischer Sklerose und verwandten Erkrankungen. In: Thomas, L. (Ed.): Labor und Diagnose (5th ed., 1998), 843 - 848, TH-Books Verlagsges. MbH, Frankfurt/Main
2. Randone, S., et al.: Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies. In: Shoenfeld, Y., et al.: Autoantibodies (2007), 231 - 238, Elsevier, Amsterdam
3. Kuwana, M., et al.: An immunodominant epitope on DNA Topoisomerase I is conformational in nature. *Arthritis Rheum* 42 (1999), 1179 - 1188
4. Aeschlimann, A., et al.: Anti-Scl-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann Rheum Dis* 48 (1989), 992 - 997
5. Von Mühlen, C. A., Tan, E. M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24 (1995), 323 - 358
6. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

15. Summary flow chart

- a. Dilute the sera 1/100 in sample buffer (100 mL, ready-to-use, orange) and mix.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with water and mix.
- c. Wash the wells once with 350 μ L wash buffer each. Dispense 100 μ L of the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue) and controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and of the diluted samples into the wells of the solid phase. Duplicate measurements are recommended. Incubate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- d. Wash the wells 4 times with 350 μ L wash buffer each.
- e. Dispense 100 μ L of the conjugate (14 mL, ready-to-use, red) into the wells. Incubate as in step c.
- f. Repeat washing step d.
- g. Dispense 100 μ L of the substrate solution (14 mL, ready-to-use, black vial) per well. Incubate as in step c. Then, add 100 μ L stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless) per well and agitate the plate briefly.
- h. Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- i. Quantitative evaluation: Determine the standard curve and, using this curve, transform the absorbance of the samples into their respective antibody concentration (U Scl-70 Ab (IgG)/mL).
- j. Qualitative evaluation: Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor shown in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the samples by dividing their absorbance by the borderline absorbance.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

Gebrauchsanweisung

EULISA Scl-70 IgG

Verwendungszweck

Enzym-Immunoassay zum Nachweis von
IgG-Autoantikörpern gegen Scl-70

Mikrotitration 96 Kavitäten
Kit bei +2-8°C lagern
Nur für in vitro-diagnostische Anwendung



Dokument No. E-23-0219-02

März, 2015

EULISA Scl-70 IgG

English: page 1
Deutsch: Seite 20



Inhalt

1. Einführung und Hintergrund
2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen
3. Testprinzip
4. Inhalt des Testkits
5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien
6. Aufbewahrung des Testkits
7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben
8. Durchführung des Tests
 - 8.3. Manuelle Durchführung
 - 8.4. Dynex DS2 automatisches ELISA System
9. Auswertung und Qualitätskontrolle
10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode
11. Testcharakteristika
 - 11.1. Standardisierung
 - 11.2. Analytische Spezifität
 - 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)
 - 11.4. Homogenität der Festphase
 - 11.5. Linearität
 - 11.6. Präzision
 - 11.7. Häufigkeitsverteilung von Scl-70-AK (IgG)
 - 11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
12. Garantie und Haftung
13. Symbole
14. Literatur
15. Kurzanleitung

Das hier beschriebene Produkt wurde in Übereinstimmung mit der IVD-Direktive 98/79/EG hergestellt.

1. Einführung und Hintergrund

Die progressive systemische Sklerose (PSS; Sklerodermie) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmun-Erkrankung des Bindegewebes, die sich hauptsächlich in einer Verdickung und Verhärtung der Haut äußert, aber auch innere Organe betreffen kann.

PSS-Patienten weisen charakteristische Autoantikörper gegen eine Reihe von Kernproteinen auf, jedoch praktisch nie mehr als 1 Spezifität zur selben Zeit. Diese Antikörper sind wertvolle Indikatoren verschiedener PSS-Subtypen und Überlappungs-Syndromen mit anderen systemisch-entzündlichen Krankheiten (1). In Abhängigkeit von der vorliegenden PSS-Variante tragen 20 - 60 % der Patienten Antikörper gegen ein basisches nicht-Histon-Protein namens Scl-70 (Sklerodermie-assoziiertes 70 kDa-Autoantigen (2)). Es wurde identifiziert als DNA-Topoisomerase I (3), ein nukleäres Schlüsselenzym, das supercoiled DNA in die topologische Konformation überführt, die für die DNA-Replikation und -Transkription benötigt wird.

Scl-70 Autoantikörper gelten als verlässlicher Marker der PSS mit einer Spezifität > 90 % (4). Sie zeigen ihre schwere Verlaufsform (diffuse PSS) an, meist mit Manifestierung an Lunge, Niere oder Herz. Patienten mit dem CREST-Syndrom, der limitierten kutanen Form der PSS, zeigen dagegen selten Scl-70 Antikörper (5).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, Scl-70 Antikörper (IgG) in menschlichem Serum quantitativ oder qualitativ zu bestimmen. Das immobilisierte Antigen ist ein hochgereinigtes Präparat rekombinanter human-DNA-Topoisomerase I, exprimiert im Baculovirus-System. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 - 30 - 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes.

2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Probenpuffer, Standards und Kontrollen enthalten Na-Azid als Präservativ. Der Waschpuffer enthält Bromonitrodioxan als Präservativ, das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Metallrohren reagieren und explosive Azide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.

Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung. Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.

3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit Scl-70 Antigen. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: Scl-70-spezifische Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgG gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an Scl-70 Antikörpern (IgG) in der Probe wider.

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit Scl-70 Antigen und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.

MWP	12x8
------------	-------------

- b. Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

BUF	SPL
------------	------------

- c. Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

- d. 6 Standards à 2,0 mL, 0 - 0,60 - 2,0 - 6,0 - 20 und 60 U Scl-70 Antikörper (IgG) / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CAL	1-6
------------	------------

- e. Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CONTROL	-
----------------	----------

CONTROL	+
----------------	----------

- f. Anti-human IgG HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

CONJ	IgG
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H₂O₂, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.



- i. Gebrauchsinformation
- j. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 und 1000 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

6. Aufbewahrung des Testkits

Der Testkit muss bei 2 - 8°C gelagert werden. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.
- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 - 8°C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben: Patientenseren als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Sie werden mit dem Probenpuffer 1:100 in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Mikrowell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

8. Durchführung des Tests

8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je 350 µL Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- b. Je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.

Die Kavitätenplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) inkubieren.

- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d. Je 100 µL Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, rot) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschrift c wiederholen.
- f. Je 100 µL Substrat (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- g. Je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

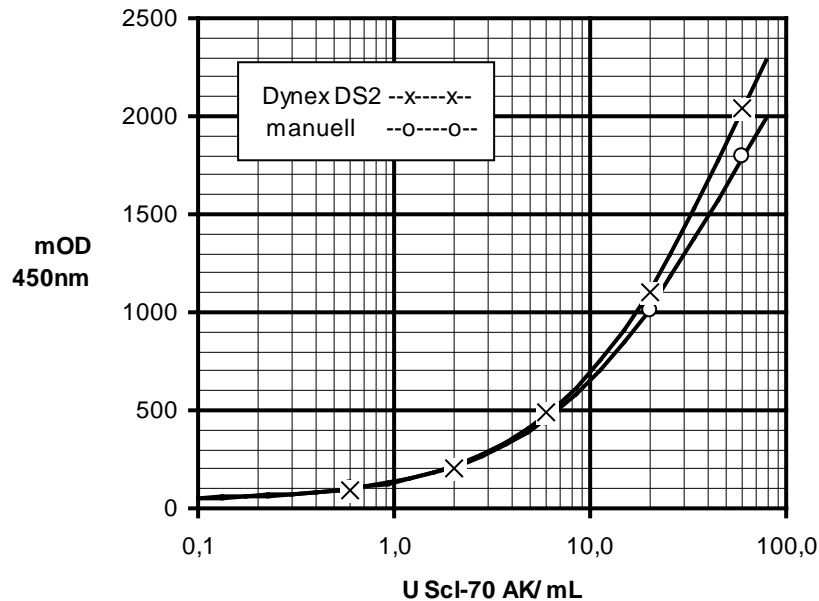
Überschüssige Reagenzien weiter bei $2 - 8^{\circ}\text{C}$ lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine entsprechende Programmdatei für die Assay-Durchführung und Auswertung kann zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts. Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

9. Auswertung und Qualitätskontrolle

Quantitative Auswertung: Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.



1411FE00.FED/StdKurveV1412J

Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die Antikörper-Konzentration in den Proben ab (U Scl-70 AK (IgG) / mL Serum).

Qualitative Auswertung: Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off) verglichen; sie errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorptioncut-off} = \text{Absorptionpositive Kontrolle} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

Absorption_{positive Kontrolle} = 1250 mOD
 Faktor = 0,35
 Absorption_{cut-off} = 1250 mOD x 0,35 = 438 mOD

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an Scl-70 AK (IgG) ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

Ratio = Absorption_{Probe} / Absorption_{cut-off}

Beispiel:

Absorption_{cut-off} = 438 mOD
 Absorption_{Probe} = 1480 mOD
 Ratio = 1480 mOD / 438 mOD = 3,4

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

Auswertung	quantitativ U Scl-70 AK (IgG) / mL Serum	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 3,2	< 0,85
cut-off	4,0	1,00
grenzwertiger Bereich	3,2 - 5,0	0,85 - 1,17
positiver Bereich	> 5,0	> 1,17

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Patient keinen erhöhten Titer an IgG-Antikörpern gegen Scl-70 aufweist. Folglich ist der schwere Verlauf der PSS eher unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen. Liegt Verdacht auf

das CREST-Syndrom vor, sollten Autoantikörper gegen das Centromer-Protein B (CENP-B) gemessen werden.

Wegen der hohen diagnostischen Spezifität der Scl-70 Autoantikörper sollte ein positives Resultat als Hinweis auf PSS interpretiert werden.

Proben mit grenzwertigen Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

11. Testcharakteristika

11.1. Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das spezifisch gegen Scl-70 gerichtete IgG-Antikörper enthält. Es wird seinerseits kalibriert an einem Satz abgestuft-positiver Seren, die ausschließlich für diesen Zweck reserviert sind. Der Reaktivitätsgrad einer Probe wird in willkürlichen Einheiten (U Scl-70 AK (IgG)/mL Serum) angegeben, da kein internationaler Standard verfügbar ist.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen Scl-70 gerichtet sind. Er wurde u.a. anhand der kommerziell verfügbaren, humanen Referenzseren des "Center of Disease Control" (CDC, Atlanta, USA) validiert. Folgende Resultate sind typisch:

Serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC-Resultat	ds-DNA	SS-B /La	--	U1-RNP	Sm	--	SS-A /Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immunfluoreszenz	homo-gen /rim	speck-led	speck-led	--	--	nuc-leolar	--	centro-mere	--	--
ELISA (U/mL)	0,9	0,4	0,5	0,5	1,2	3,3	0,5	0,4	>60	0,3

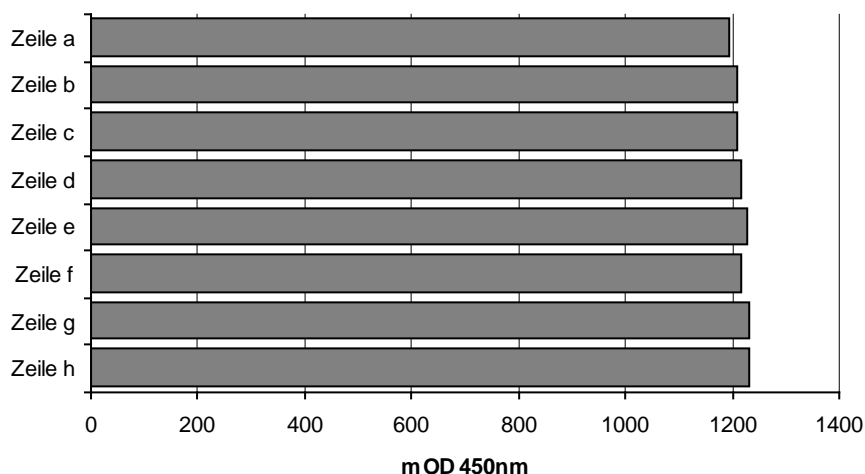
11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

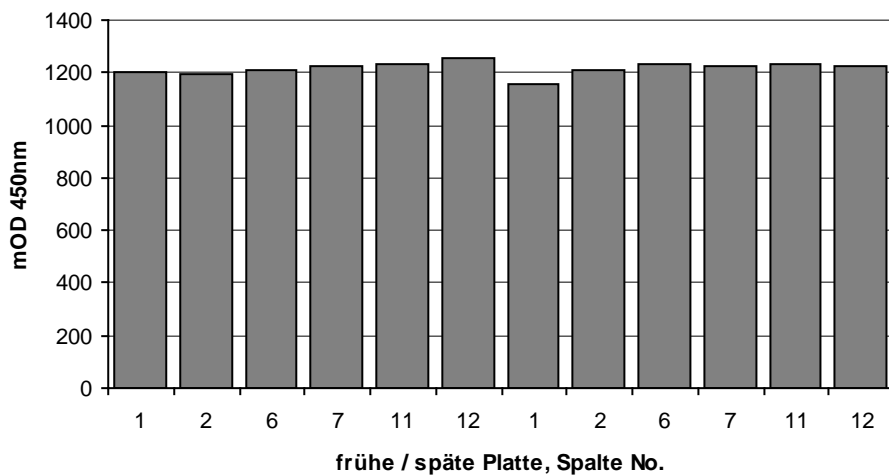
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu $< 0,2$ U Scl-70 AK (IgG)/mL Serum bestimmt (n = 24). Empfohlener Messbereich: 0,5 - 60 U/mL.

11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten. Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten $< 8\%$. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 0702E).

Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
Zeile a	1144	1186	1201	1186	1250	1243	1142	1169	1201	1189	1201	1211	1194	2,8
Zeile b	1211	1163	1204	1197	1206	1258	1125	1222	1238	1236	1230	1226	1210	3,0
Zeile c	1218	1173	1196	1212	1181	1234	1155	1217	1265	1243	1219	1189	1209	2,6
Zeile d	1198	1178	1205	1242	1223	1269	1154	1215	1233	1225	1228	1229	1217	2,5
Zeile e	1216	1199	1225	1250	1271	1261	1187	1195	1228	1224	1244	1232	1228	2,1
Zeile f	1223	1216	1197	1242	1198	1244	1136	1209	1244	1216	1241	1245	1218	2,6
Zeile g	1205	1232	1239	1209	1276	1287	1157	1205	1233	1238	1246	1263	1233	2,9
Zeile h	1198	1228	1207	1262	1273	1270	1206	1226	1241	1219	1266	1193	1232	2,4
MW	1202	1197	1209	1225	1235	1258	1158	1207	1235	1224	1234	1224	1217	
VK %	2,1	2,2	1,2	2,2	3,0	1,4	2,3	1,5	1,4	1,4	1,6	2,1		2,7

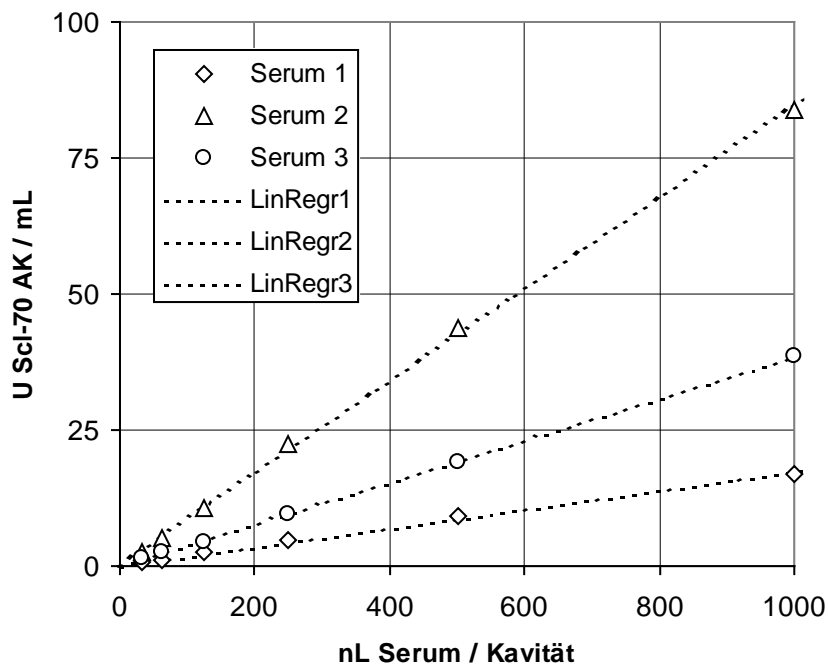




1411FE00.FED/FphHomV1412J

11.5. Linearität

Um die Dosis / Wirkungs-Beziehung des Tests zu bestimmen, wurden positive Seren in serieller Zweifachverdünnung gemessen. Akzeptanz-Kriterium: Die lineare Regression vierer sukzessiver Verdünnungen muss einen Korrelationsfaktor > 0,98 ergeben. Ein typisches Ergebnis ist hier abgebildet.



1411FE00.FED/LinearV1412J

11.6. Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen.

a. Intra- und Inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert (MW) U/mL	Variabilität (VK, %) intra-Assay	inter-Assay
1	7,0	3,5	4,7
2	14	8,0	10,0
3	26	2,6	9,0

b. Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	7,6	2,0
2	15	7,8
3	31	2,8

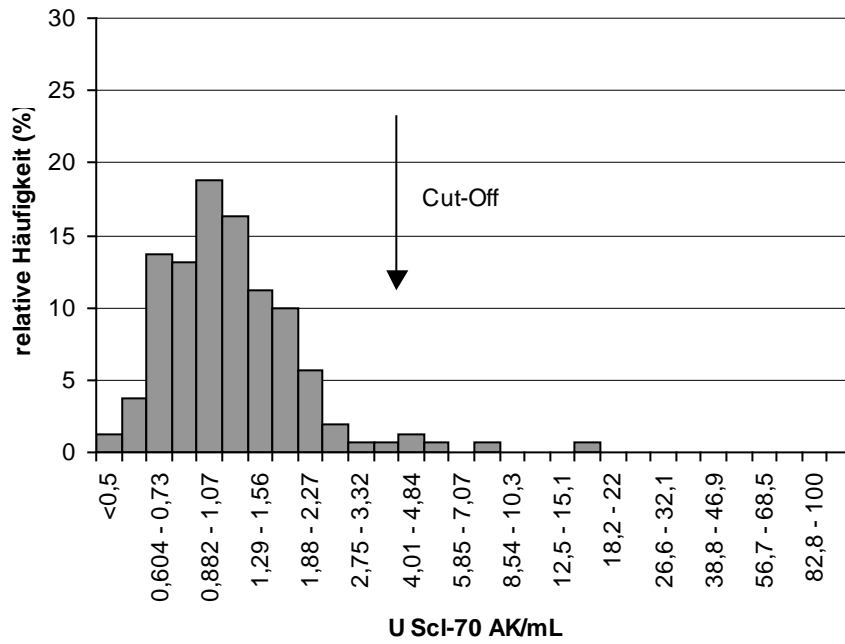
c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	7,6	2,9
2	15	4,5
3	31	2,4

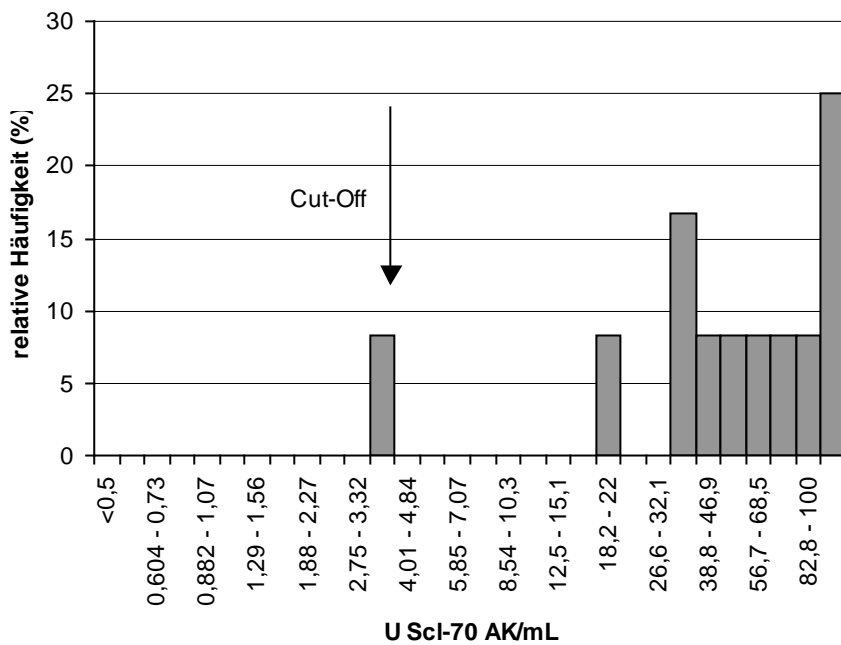
11.7. Häufigkeitsverteilung von Scl-70 AK (IgG)

Diese wurde bestimmt in einem Blutspender-Serenkollektiv, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und einem Kollektiv von Seren, die in einem CE-konformen Referenz-ELISA für Scl-70 Autoantikörper (IgG) positiv gefunden worden oder klinisch definiert waren. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

Blutspender-Seren



Positiv-Seren



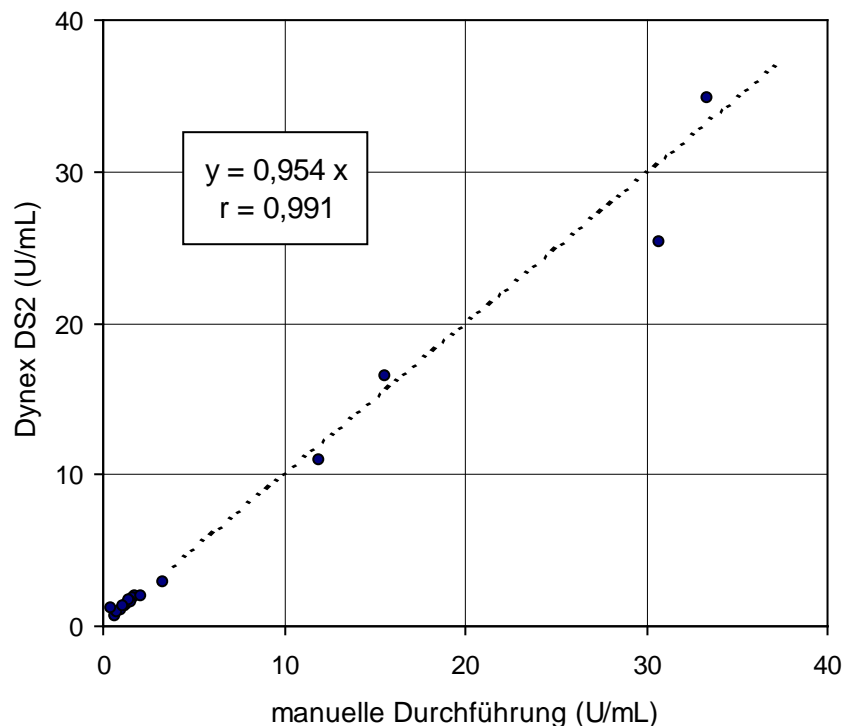
Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	12
MW:	1,4 U/mL	MW:	79 U/mL
MW + s:	2,8 U/mL	MW - s:	15 U/mL
MW + 2s:	4,3 U/mL	MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	1,1 U/mL	Median:	60 U/mL
95. Perzentile:	2,4 U/mL	5. Perzentile:	13 U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 4,0 U/mL bestimmt (6). Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von etwa 97 bzw. annähernd 100 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



1411FE00.FED/KorrDynexDS2-V1412J

Variabilität: Mit Testkits aus einer einzigen Produktions-Charge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System:

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n = 16)	mittl. VK = 3,3 %	mittl. VK = 4,9 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 5,4 %	mittl. VK = 7,2 %

12. Garantie und Haftung

Euro Diagnostica AB garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert Euro Diagnostica AB jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann Euro Diagnostica AB keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13. Symbole



Artikelnummer



Chargencode



Ausreichend für $\langle n \rangle$ Prüfungen



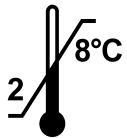
In-vitro-Diagnostikum



Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika



Von Sonnenlicht fernhalten



Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten



Biologische Risiken



Hersteller

14. Literatur

1. Mierau, R., Genth, E.: Autoantikörper bei systemischer Sklerose und verwandten Erkrankungen. In: Thomas, L. (Ed.): Labor und Diagnose (5th ed., 1998), 843 - 848, TH-Books Verlagsges. MbH, Frankfurt/Main
2. Randone, S., et al.: Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies. In: Shoenfeld, Y., et al.: Autoantibodies (2007), 231 - 238, Elsevier, Amsterdam
3. Kuwana, M., et al.: An immunodominant epitope on DNA Topoisomerase I is conformational in nature. *Arthritis Rheum* 42 (1999), 1179 - 1188
4. Aeschlimann, A., et al.: Anti-Scl-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann Rheum Dis* 48 (1989), 992 - 997
5. Von Mühlen, C. A., Tan, E. M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24 (1995), 323 - 358
6. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

15. Kurzanleitung

- a. Die Seren 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 µL Waschpuffer waschen. Dann je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen. 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 µL des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 µL des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 µL Stoplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Quantitative Auswertung: Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (U Sci-70 AK (IgG)/mL Serum) umformen.
- j. Qualitative Auswertung: Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

1411FE60.FWD / 31030