

Instructions for Use

EULISA ANA Screen 6 IgG

Intended Use

Enzyme immunoassay for the detection of
autoantibodies IgG against RNP, Sm,
Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70 and Jo-1

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



Document No. E-23-0223-02

March, 2015

EULISA Screen 6 IgG

English: page 1

Deutsch: Seite 20



214096



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 ANA (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

Circulating autoantibodies against various intracellular antigens (antinuclear antibodies, ANA) are characteristic for systemic, autoimmune-mediated rheumatic diseases of the connective tissue (1, 2, 3, 4). These comprise Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Mixed Connective Tissue Disease (MCTD), Sjögren's Syndrome (SS) A and B, Progressive Systemic Sclerosis (PSS, Scleroderma), and Polymyositis (PM).

The diagnosis of the above disorders is often difficult, due to overlapping symptoms, and therefore usually supported by measuring their associated antibodies. 6 autoantigens specifically recognised by these antibodies are immobilised on the solid phase of the present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA):

antigen	source	disease	autoantibody prevalence (5)
RNP (proteins A, C, 68kDa)	recombinant	MCTD	95 %
		SLE	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (proteins B, B', D)	bovine thymus	SLE	12 - 39 %
		MCTD	7 %
SS-A/Ro (60kDa-protein)	bovine thymus	SS	60 - 100 %
		SLE	45 - 50 %
		MCTD	15 - 30 %
		PSS	5 - 7 %
		PM	5 - 7 %
SS-B/La	recombinant	SS	30 - 90 %
		SLE	15 - 30 %
		MCTD	5 - 15 %
Sci-70 (DNA-topoisomerase 1)	recombinant	PSS	20 - 76 %
Jo-1 (Histidyl-tRNA-synthetase)	recombinant	PM	20 - 40 %

The test is designed for the qualitative, summary determination of the respective autoantibodies (IgG) in human serum, without the ability to discriminate between them. It is intended as initial screen test for an overall diagnosis of the above disorders. The test is fast (incubation time 30 / 30 / 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). 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 and the 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 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 a balanced mixture of the autoantigens quoted above. On this surface, the following immunological reactions take place:

1st reaction: Antigen-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 antigen-specific autoantibodies (IgG) in the sample.

4. Contents of the kit

- a. 1 microwell plate, coated with a mixture of the above antigens, 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. Negative and positive control, 3,0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

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

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

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

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

- f. 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
-------------	------------

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

SOLN	STOP
-------------	-------------

- h. Directions for use
- i. 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 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 controls (3,0 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

The assay is evaluated in a qualitative manner: the absorbance of the samples is compared to the borderline absorbance (= cut-off absorbance). The cut-off absorbance is determined by means of the positive control which at the same time functions as calibrator; according to the formula:

$$\text{absorbance}_{\text{borderline}} = \text{absorbance}_{\text{positive control}} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis (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 the degree of a sample's reactivity, the ratio between sample and borderline absorbance is calculated:

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

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 control (calibrator) and negative control check the assay performance. Their acceptable ranges 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:

	ratio
normal (negative) range	< 0,82
cut-off	1,00
equivocal range	0,82 - 1,20
positive range	> 1,20

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 probably does not have an elevated level of IgG antibodies to the antigens listed in the beginning. Therefore, presence of a systemic rheumatic disease is rather unlikely but can nevertheless not be excluded.

A positive result should be considered as an indication for one of the above listed diseases. As follow-up diagnosis, the specificity of the causative autoantibody and hence the identity of the autoimmune disorder should be determined. This can be achieved by means of a differentiating profile ELISA.

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 directed at each of the immobilised autoantigens. It constitutes the stock material for both controls of the test. The proportion of the antibodies is adjusted in such a manner that each one contributes approximately the same fraction to the overall signal.

The stock preparation is calibrated against a set of monospecifically positive sera solely reserved for this purpose. The degree of sample reactivity is expressed as summary ratio, as outlined above.

11.2. Analytical specificity

The test permits the specific determination of human IgG antibodies, directed at the autoantigens quoted in article 1. It has been validated (among other criteria) using human reference sera from the Center of Disease Control (CDC; Atlanta, USA) which are commercially available. The following results (ratio values) 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
Immun- fluoresc.	homo- gen	speck- led	speck- led	--	--	nuc- leolar	--	centro- mere	--	--
ratio	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

Remark: The corresponding ANA Profile 8 ELISA which differentiates between the antigens revealed: Serum # 1 reacts not only with dsDNA but also with Sm. Serum # 6 shows ratio values ≤ 1 towards all single antigens. Serum # 8 reacts strongly with centromere-protein B which is not included in the antigen range of the present ANA Screen 6 ELISA.

11.3. Detection limit (analytical sensitivity)

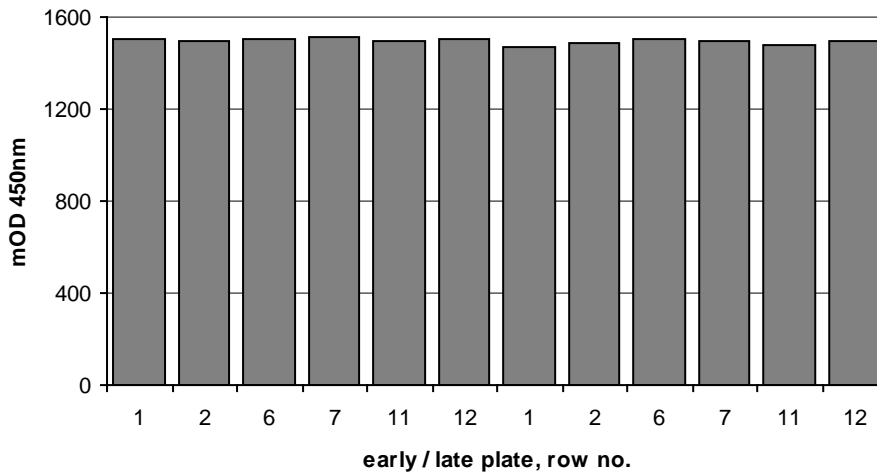
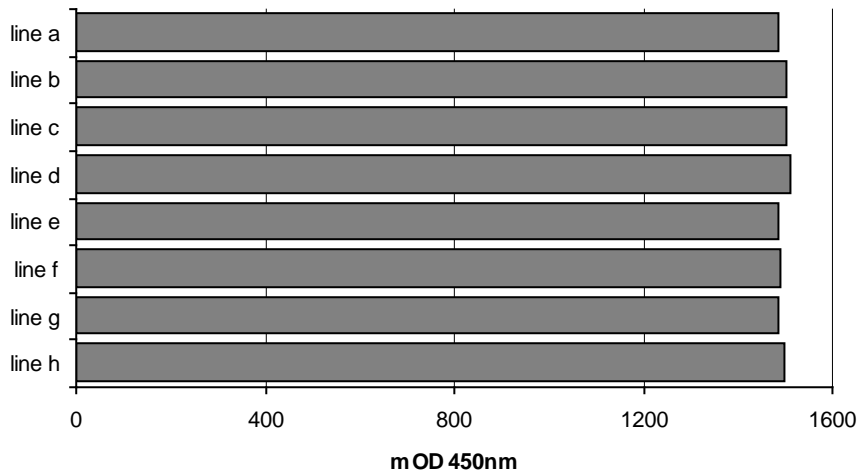
The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as $< 0,4$ (ratio; n = 24).

Recommended measuring range: $0,5 < \text{ratio} < 6$

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. 2308I) of such an analysis.

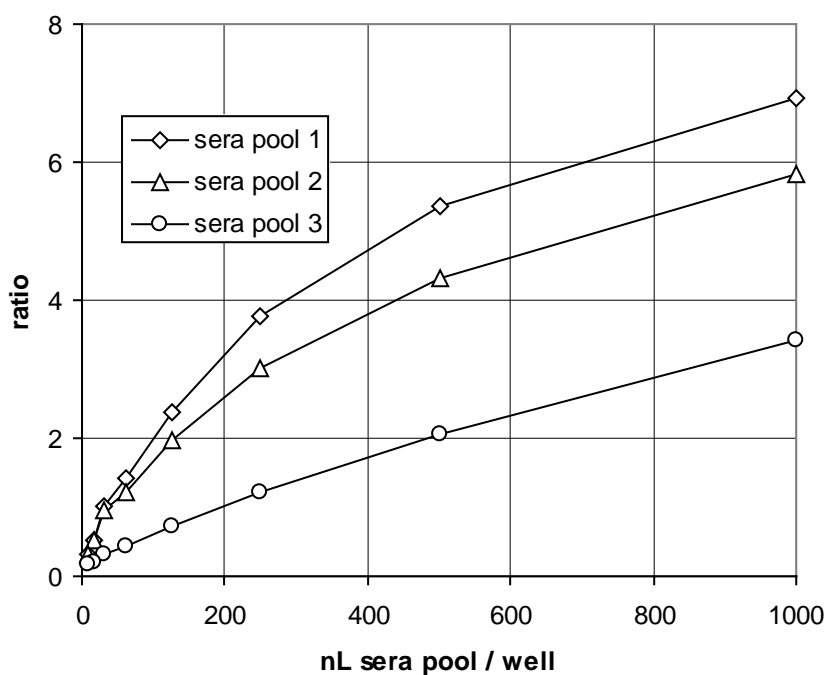
plate	early (n/10)						late (9n/10)						mean cv%	
row	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
line a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
line b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
line c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
line d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
line e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
line f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
line g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
line h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
mean	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	1495	
cv%	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		1,5



18111FE00.FED/FphHomV1411J

11.5. Dose-response relationship

In order to assess this feature of the ELISA, several pools of individual sera with heterogeneous reactivity were measured in serial 2-fold dilution. A typical result is depicted below. An approximately linear relationship between sample concentration and resulting ratio is restricted to ratio values < 2. This is due to the qualitative evaluation manner (cf. article 9) and contrasts ELISAs which are evaluated quantitatively by means of a standard curve.



1811FE00.FED/LinearV1411J

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	ratio	variability (cv, %)	
		intra-assay	inter-assay
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

b. Operator to operator variability (n = 12)

sample	ratio	variability (cv, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

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

sample	ratio	variability (cv, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

11.7. Frequency distribution of ANA (IgG)

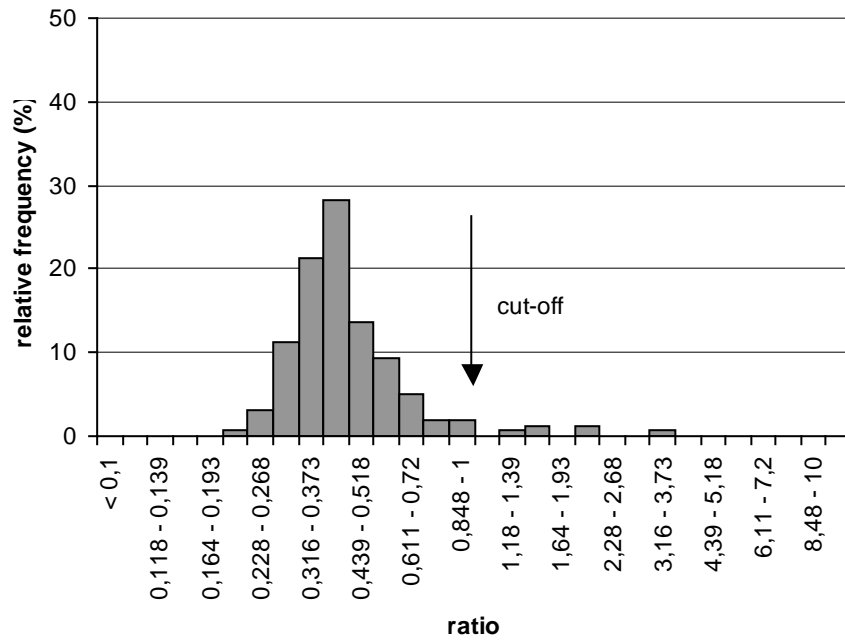
This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of sera which had been found positive by independent methods (e.g. monospecific, CE-compliant reference ELISAs, immune fluorescence assays (IFA)) for at least one parameter or were clinically defined.

The following summary distribution of the analytes was observed (s = standard deviation):

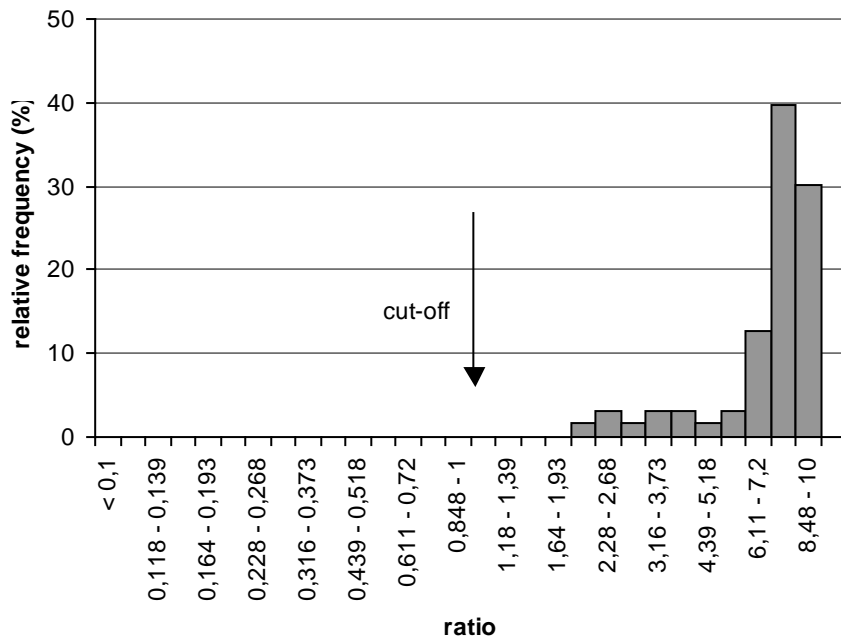
blood donor sera		positive sera	
n:	160	n:	63
mean:	ratio = 0,49	mean:	ratio = 7,3
mean + s:	ratio = 0,84	mean - s:	ratio = 5,4
mean + 2s:	ratio = 1,19	mean - 2s:	ratio = 3,5
median:	ratio = 0,40	median:	ratio = 7,8
95 th percentile:	ratio = 0,94	5 th percentile:	ratio = 2,9

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off of the ANA Screen 6 ELISA according to (6). The data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of about 96 and nearly 100 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.

blood donor sera



positive sera

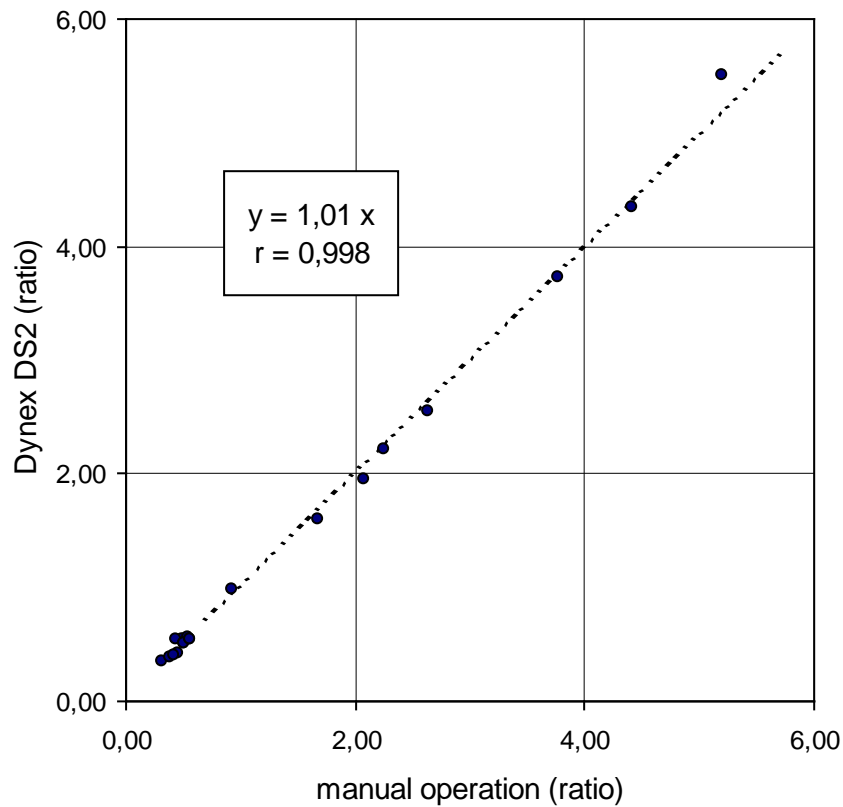


11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

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 = 1,4 %	mean cv = 1,9 %
inter-assay variability (n = 48)	mean cv = 2,3 %	mean cv = 3,6 %

Correlation:



1811FE00.FED/Korr/DynexDS2-V1411J

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



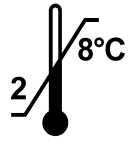
In vitro diagnostic medical device



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. Nakamura, R. M., Tan, E. M.: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 12 (1992), 1 - 23
2. Guma, M., Keil, L. B.: Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. *J Clin Immunoassay* 17 (1994), 98 - 107
3. Fritzler, M. J.: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 23 (1996), 133 - 145
4. Hietarinta, M., Lassila, O.: Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. *Ann Med* 28 (1996), 283 - 291
5. Messinger, M.: Autoantikörper bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Kollagenosen). In: L. Thomas (ed.): *Labor und Diagnose* (2005), TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 1139 - 1161
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 controls (3,0 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. Evaluation: Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor quoted 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 ANA Screen 6 IgG

Verwendungszweck

Enzym-Immunoassay zum Nachweis von
IgG-Autoantikörpern gegen RNP, Sm,
Ro (SS-A), La (SS-B), Scl-70 und Jo-1

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



Dokument No. E-23-0223-02

März, 2015

EULISA ANA Screen 6 IgG

English: page 1

Deutsch: Seite 20



214096



96

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 der ANA (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

Zirkulierende Autoantikörper gegen vielfältige zelluläre Antigene (antinukleäre Antikörper, ANA) sind charakteristisch für systemische, autoimmun-bedingte, rheumatische Erkrankungen des Bindegewebes (1, 2, 3, 4). Zu diesen zählen: Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Mischkollagenose (Mixed Connective Tissue Disease, MCTD), Sjögren-Syndrom (SS) A und B, progressive systemische Sklerodermie (PSS) bzw. CREST-Syndrom und Polymyositis (PM).

Die Diagnose dieser Krankheiten ist oft wegen überlappender Symptome schwierig; sie wird daher meist durch Messung der jeweils assoziierten Autoantikörper unterstützt. 6 der von diesen Antikörpern spezifisch erkannten Antigene sind auf der Festphase des vorliegenden Enzyme-linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) immobilisiert:

Antigen	Quelle	Krankheit	ungefähre Antikörperprävalenz (5)
RNP (Proteine A, C, 68kDa)	rekombinant	MCTD	95 %
		SLE	30 - 40 %
		PM	14 %
		SS	4 %
Sm (Proteine B, B', D)	Kalbsthymus	SLE	12 - 39 %
		MCTD	7 %
SS-A/Ro (60kDa-Protein)	Kalbsthymus	SS	60 - 100 %
		SLE	45 - 50 %
		MCTD	15 - 30 %
		PSS	5 - 7 %
SS-B/La	rekombinant	PM	5 - 7 %
		SS	30 - 90 %
		SLE	15 - 30 %
ScI-70 (DNA-Topoisomerase 1)	rekombinant	MCTD	5 - 15 %
Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase)	rekombinant	PSS	20 - 76 %
		PM	20 - 40 %

Der Test soll qualitativ und summarisch die betreffenden IgG-Autoantikörper in menschlichem Serum bestimmen. Er kann jedoch nicht zwischen ihnen diskriminieren und dient daher der pauschalen Eingangsdiaagnose der o.g. Erkrankungen. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 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 Bromnitrodioxan als Präservativ, das Konjugat Methylisothiazolon / Bromnitrodioxan. 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 Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die 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 einer ausgewogenen Mischung der o.g. Autoantigene. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: Antigen-spezifische Antikörper aus der Probe binden an ihr jeweiliges immobilisiertes 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 summarisch die Konzentration aller Antigen-spezifischen Autoantikörper (IgG) in der Probe wider.

4. Contents of the kit

- a. 1 Mikrowell-Platte, mit einer Mischung der o.g. Autoantigene beschichtet. 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. Negative und positive Kontrolle, je 3,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

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

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

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

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

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

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

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

SOLN	STOP
-------------	-------------

- h. Gebrauchsinformation
i. 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, die 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 ± 3°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. Die Kontrollen (je 3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und die verdünnten Proben zügig in die Kavitäten dispensieren; 100 µL pro Kavität. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen.

Die Platte 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°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

Der Test wird qualitativ ausgewertet: Die Absorption der Proben wird verglichen mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off). Die cut-off-Absorption wird bestimmt anhand der positiven Kontrolle, die gleichzeitig als Kalibrator fungiert, gemäß der Formel:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{Positivkontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist für jeden Parameter im Chargenspezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe reagiert, berechnet man den Ratio-Wert zwischen Proben- und cut-off-Absorption, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Qualitätskontrolle: Die negative und die positive Kontrolle (Kalibrator) dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweils akzeptablen Bereiche sind im Chargenspezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests ungültig.

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:

	Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 0,82
cut-off	1,00
grenzwertiger Bereich	0,82 - 1,20
positiver Bereich	> 1,20

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

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Patient vermutlich keinen erhöhten Titer an IgG-Antikörpern gegen die eingangs genannten Antigene aufweist. Folglich liegt vermutlich keine systemische rheumatische Erkrankung vor, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein positives Ergebnis sollte als Hinweis auf eine der o.g. Erkrankungen interpretiert werden. Im nächsten Schritt sollte die Spezifität des ursächlichen Antikörpers bestimmt und damit die assoziierte Autoimmun-Erkrankung identifiziert werden; bspw. mit einem differenzierenden Profil-ELISA.

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 IgG-Antikörper gegen jedes der immobilisierten Autoantigene enthält. Es bildet das Ausgangsmaterial beider Testkontrollen. Das Verhältnis der Antikörper wurde so eingestellt, dass jeder von ihnen etwa denselben Anteil zum Gesamtsignal beisteuert.

Das Präparat wurde seinerseits kalibriert an einem Satz monospezifisch-positiver Seren, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist. Der Grad der Reaktivität einer Probe wird als Pauschalratio angegeben, wie oben ausgeführt.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen die in Abschnitt 1 genannten Antigene gerichtet sind. Er wurde u.a. anhand der allgemein zugänglichen, humanen Referenzseren des "Center of Disease Control" (CDC, Atlanta, USA) validiert. Folgende Resultate (Ratio-Werte) 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	--	ScI- 70	Jo- 1
Immun- fluoreszenz	homo- gen	speck- led	speck- led	--	--	nuc- leolar	--	centro- mere	--	--
Ratio	2,1	8,7	7,6	3,3	8,4	1,0	6,2	0,3	6,6	8,2

Anmerkung: Der korrespondierende ANA Profil 8 ELISA, der zwischen den Antigenen diskriminiert, zeigt, dass Serum No. 1 nicht nur mit dsDNA, sondern auch mit Sm reagiert. Serum No. 6 weist Ratiowerte ≤ 1 bzgl. aller Einzelantigene auf. Serum No. 8 reagiert stark mit Centromer-Protein B, das jedoch nicht zum Antigenesortiment des vorliegenden ANA Screen 6 ELISA gehört.

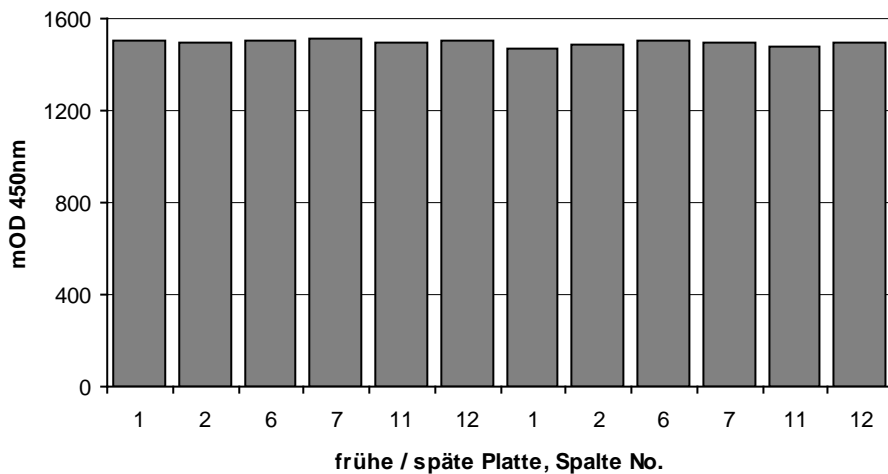
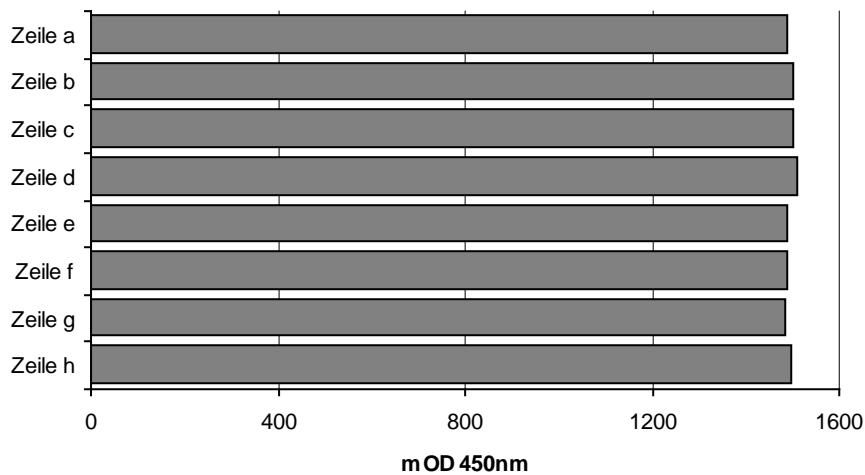
11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die der gemittelten Absorption des Probenpuffers entspricht, zu der die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu $< 0,4$ (Ratio; n = 24) bestimmt. Empfohlener Meßbereich: $0,5 < \text{Ratio} < 6$

11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer IgG-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: 2308I).

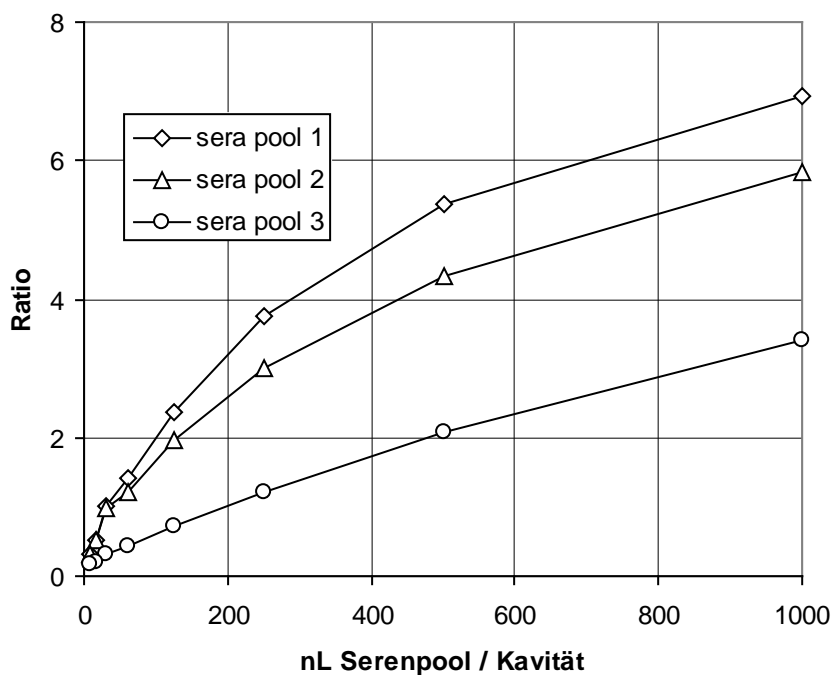
Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
	1	2	6	7	11	12	1	2	6	7	11	12		
Zeile a	1464	1480	1490	1527	1476	1475	1490	1492	1495	1461	1478	1525	1488	1,4
Zeile b	1514	1522	1528	1511	1487	1489	1472	1480	1504	1534	1484	1519	1504	1,4
Zeile c	1488	1520	1518	1531	1524	1509	1464	1503	1529	1506	1463	1484	1503	1,6
Zeile d	1517	1500	1518	1524	1533	1529	1497	1508	1528	1522	1461	1491	1511	1,4
Zeile e	1504	1492	1499	1472	1473	1503	1471	1483	1498	1501	1497	1457	1488	1,1
Zeile f	1480	1482	1468	1505	1478	1498	1438	1502	1503	1488	1510	1515	1489	1,4
Zeile g	1493	1465	1478	1493	1512	1507	1457	1460	1481	1483	1475	1500	1484	1,2
Zeile h	1545	1516	1504	1519	1517	1496	1466	1487	1504	1497	1468	1457	1498	1,7
MW	1501	1497	1500	1510	1500	1501	1469	1489	1505	1499	1480	1494	1495	
VK %	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,1	1,8		1,5



18111FE00.FED/FphHomV1411J

11.5. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um diese Eigenschaft des ELISAs zu bestimmen, wurden mehrere Pools individueller Seren mit heterogener Reaktivität in serieller 2-facher Verdünnung gemessen. Die Abbildung unten zeigt ein typisches Ergebnis. Eine annähernd lineare Beziehung zwischen Probenkonzentration und resultierender Ratio beschränkt sich auf Ratio-Werte < 2. Dies wird durch die qualitative Auswertung verursacht (vgl. Abschnitt 9); im Unterschied zu quantitativen ELISAs, die mit einer Standardkurve ausgewertet werden.



1811FE00.FED/Linear/V1411J

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	Ratio	Variabilität (VK, %) intra-Assay	inter-Assay
1	1,2	3,0	3,3
2	3,2	2,0	3,0
3	4,9	1,8	4,1

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

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1,2	1,7
2	3,2	1,7
3	4,7	1,8

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

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1,0	11,9
2	2,9	11,9
3	4,4	9,2

11.7. Häufigkeits-Verteilung der ANA (IgG)

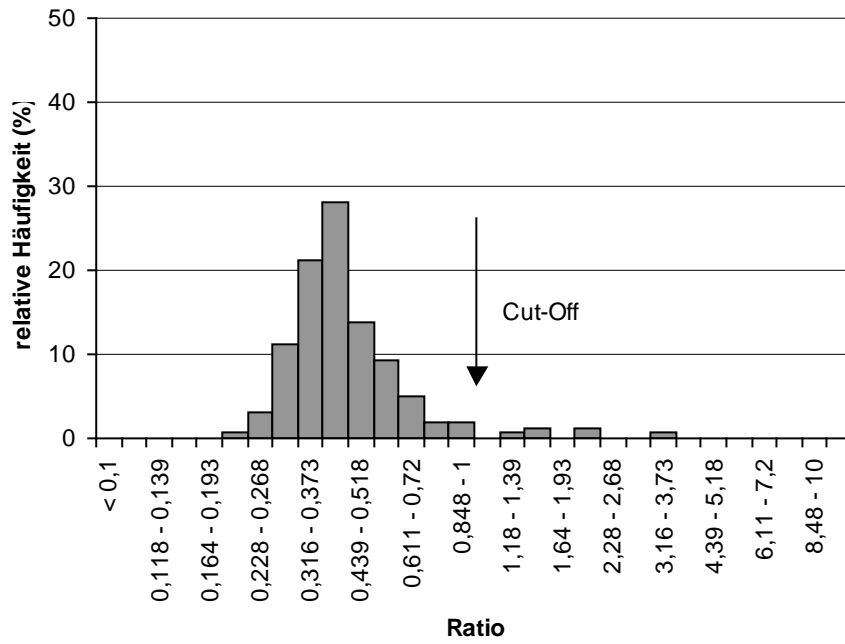
Dies wurde analysiert mit einem Serenkollektiv von Blutspendern, gleichmäßig nach Geschlecht und Alter verteilt, und mit einem Kollektiv von Seren, die mit unabhängigen Methoden (bspw. monospezifische, CE-konforme Referenz-ELISAs, Immunfluoreszenz-Assays (IFA)) für mindestens einen Parameter positiv gefunden worden oder klinisch definiert waren.

Folgende summarische Verteilung der Analyte wurde beobachtet (MW = Mittelwert, s = Standardabweichung):

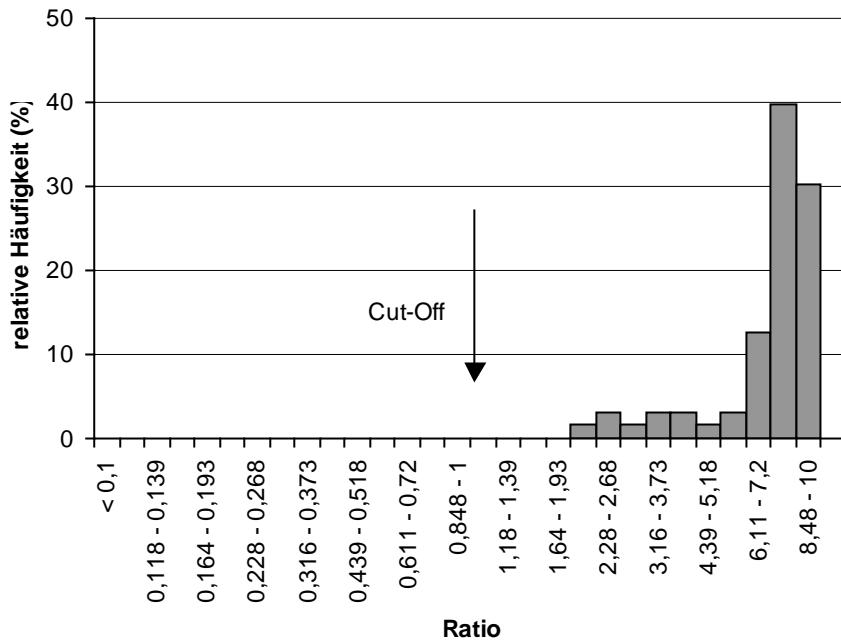
Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	63
MW:	Ratio = 0,49	MW:	Ratio = 7,3
MW + s:	Ratio = 0,84	MW - s:	Ratio = 5,4
MW + 2s:	Ratio = 1,19	MW - 2s:	Ratio = 3,5
Median:	Ratio = 0,40	Median:	Ratio = 7,8
95. Perzentile:	Ratio = 0,94	5. Perzentile:	Ratio = 2,9

Der Cut-off des ANA Screen 6 ELISAs wurde mittels ROC-Analyse dieser Daten nach (6) bestimmt. Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von etwa 96 bzw. annähernd 100 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

Blutspender-Seren



Positiv-Seren

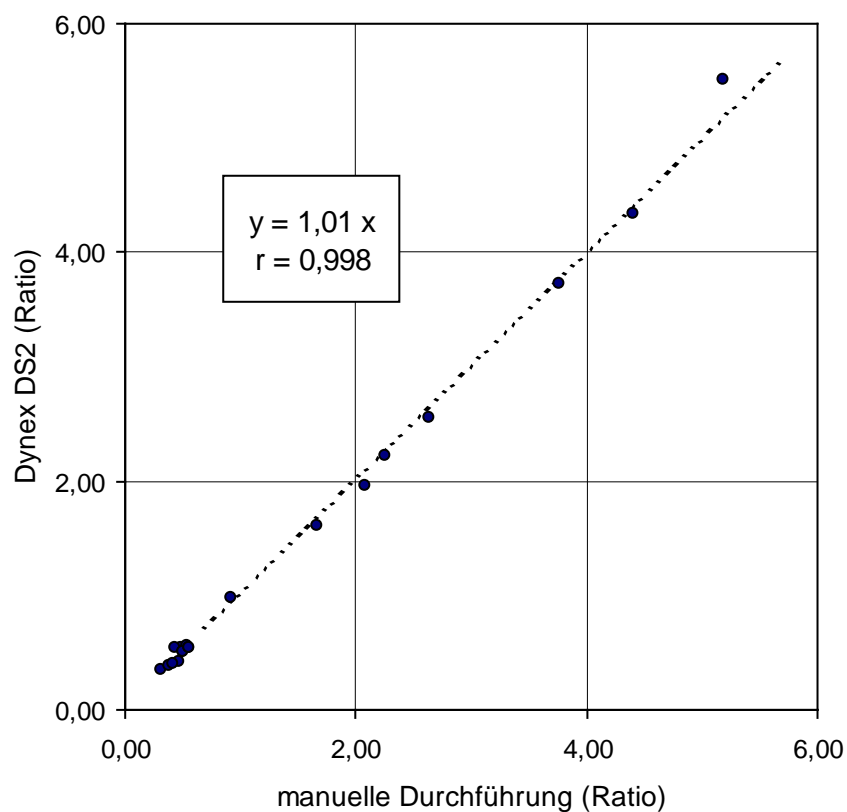


1811FE00.FED/HäufigPlotV1411.J

11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
 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 = 1,4 %	mittl. VK = 1,9 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 2,3 %	mittl. VK = 3,6 %

Korrelation:



1811FE00.FED/Korr/DynexDS2V1411J

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. Nakamura, R. M., Tan, E. M.: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 12 (1992), 1 - 23
2. Guma, M., Keil, L. B.: Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. *J Clin Immunoassay* 17 (1994), 98 - 107
3. Fritzler, M. J.: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 23 (1996), 133 - 145
4. Hietarinta, M., Lassila, O.: Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. *Ann Med* 28 (1996), 283 - 291
5. Messinger, M.: Autoantikörper bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Kollagenosen). In: L. Thomas (ed.): *Labor und Diagnose* (2005), TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 1139 - 1161
6. Sommer, R., und 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. 100 µL der Kontrollen (3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten der Festphase dispensieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen. 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. Auswertung: Die cut-off-Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysenzertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die cut-off-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