

ANA Profil 8

**ELISA zur qualitativen Bestimmung
von Autoantikörpern (IgG) gegen
dsDNA, RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La,
Sci-70, CENP-B und Jo-1**

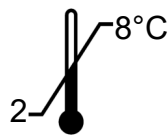
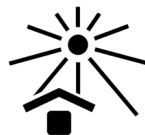
Gebrauchsinformation



1711FE00.FWD



12 x 8 Bestimmungen



STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (FRG)
Tel./Fax: +49 7664 60025-4 / -5
Email: info@steffens-biotec.com

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
 - 8.1. Manuelle Durchführung
 - 8.2. 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. Dosis-Wirkungs-Beziehung
 - 11.6. Präzision
 - 11.7. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen 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 entspricht den Anforderungen der IVD-Direktive 98/79/EG.

Dokument Id.-No. / Version: 1711FE30.FWD.doc / 2018-07-06

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 Erythematodes (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. 8 der von diesen Antikörpern spezifisch erkannten Antigene sind auf der Festphase des vorliegenden Enzyme-linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) zeilenweise immobilisiert:

Fest- phase Zeile	Antigen	Quelle	Krank- heit	ungefähre Antikörper- prävalenz (5)
A	dsDNA	Plasmid	SLE	60 - 90 %
B	RNP (Proteine A, C, 68kDa)	rekombinant	MCTD	95 %
			SLE	30 - 40 %
			PM	14 %
			SS	4 %
C	Sm (Proteine B, B', D)	Kalbsthymus	SLE	12 - 39 %
			MCTD	7 %
D	SS-A/Ro (60kDa-Protein)	Kalbsthymus	SS	60 - 100 %
			SLE	45 - 50 %
			MCTD	15 - 30 %
			PSS	5 - 7 %
			PM	5 - 7 %
E	SS-B/La	rekombinant	SS	30 - 90 %
			SLE	15 - 30 %
			MCTD	5 - 15 %
F	Scl-70 (DNA-Topoisomerase 1)	rekombinant	PSS	20 - 76 %
G	CENP-B (Centromer-Protein B)	rekombinant	CREST	40 - 80 %
H	Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase)	rekombinant	PM	20 - 40 %

Der Test dient dazu, in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) qualitativ die individuellen IgG-Autoantikörper zu bestimmen, die gegen eines der o.g. Antigene gerichtet sind; zur Eingangsdiagnose bei Verdacht auf eine der assoziierten Erkrankungen. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase für 1 - 12 Analysen, gebrauchsfertige Reagenzien). Eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes; die Positivkontrolle dient gleichzeitig als Kalibrator für die Testauswertung.

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. Er darf nur von geschultem Personal eingesetzt werden. Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Als antimikrobielles Reagenz enthalten der Probenpuffer und die Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und 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 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, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind zeilenweise beschichtet mit den o.g. Autoantigenen. 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 in jeder Zeile der Festphase spiegelt die Konzentration des jeweiligen Antigen-spezifischen Autoantikörpers (IgG) in der Probe wider (8 Werte pro Probe).

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, zeilenweise mit den 8 o.g. individuellen Autoantigenen beschichtet. Hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 einzelnen Streifen, sodaß der Test flexibel und ökonomisch verwendet werden kann.

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. Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- 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: Patientenserum als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Neben Serum ist auch EDTA- oder Citrat-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet; Heparin-behandeltes Plasma jedoch nicht.

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

Die Proben 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, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-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. Auftaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

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 (1 - 10) zügig in die Kavitäten dispensieren, wie unten angegeben; 100 μL pro Kavität.

dsDNA	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RNP	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sm	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SS-A/Ro	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SS-B/La	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Scl-70	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CENP-B	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Jo-1	−	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

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 Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei 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), getrennt für jeden der 8 Parameter. Die jeweilige cut-off-Absorption (8 individuelle Werte) 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 mit den verschiedenen Antigenen reagiert, berechnet man den jeweiligen Ratio-Wert zwischen Proben- und cut-off-Absorption; und zwar 8 x pro Probe, 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 positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweils akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen 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

Um die cut off-Konzentration (d.h. Ratio = 1,0) jedes ANA im vorliegenden Test zu bestimmen, wurden ein Normalseren-Kollektiv und die jeweiligen Positiv-Kollektive gemessen. Diese Daten wurden anschließend Parameter für Parameter einer ROC-Analyse gemäß (6) unterzogen; vgl. Abschnitt 11.7.

Die so ermittelten cut-off-Werte führen zu den im Folgenden beschriebenen Testcharakteristika. Auf der Basis dieser Messungen schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

	Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 0,80
cut-off	1,00
grenzwertiger Bereich	0,80 - 1,25
positiver Bereich	> 1,25

Diese Spezifikationen gelten einheitlich für alle 8 Parameter. Sie sind allerdings 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 das betreffende Antigen aufweist. Folglich ist die korrespondierende systemische Autoimmunkrankheit (wie eingangs beschrieben) eher unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein positives Ergebnis sollte als Hinweis auf die assoziierte Erkrankung interpretiert werden. Es empfiehlt sich, anschließend den ursächlichen Autoantikörper quantitativ in einem monospezifischen ELISA zu bestimmen.

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 Antigene enthält. Es bildet das Ausgangsmaterial beider Testkontrollen. Das Verhältnis der Antikörper wurde so eingestellt, dass die Kontrollen auf allen 8 Festphasen (Zeilen der Mikrowell-Platte) ungefähr dasselbe Signal erzeugen.

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 Ratio angegeben, wie oben ausgeführt; individuell für jeden der 8 Parameter.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch und differenziell humane IgG-Antikörper nach, die gegen eines der angegebenen 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	--	Scl-70	Jo-1
Immunfluoreszenz	homo-gen	speck-led	speck-led	--	--	nuc-leolar	--	centro-mere	--	--
dsDNA	3,5	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,4	0,2	0,4	0,1
RNP	0,8	0,2	5,0	3,9	5,3	1,0	0,3	0,2	0,3	0,2
Sm	1,8	0,2	1,6	0,2	5,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
SS-A/Ro	0,4	2,9	4,2	0,4	1,0	0,2	5,7	0,2	0,7	0,2
SS-B/La	0,2	5,0	4,2	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	0,3	0,2
Scl-70	0,3	0,2	0,3	0,3	0,6	1,0	0,2	0,2	5,6	0,2
CENP-B	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	4,4	0,3	0,2
Jo-1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	7,7

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 < 0,2 (Ratio; n = 12) für jeden der 8 Parameter bestimmt.

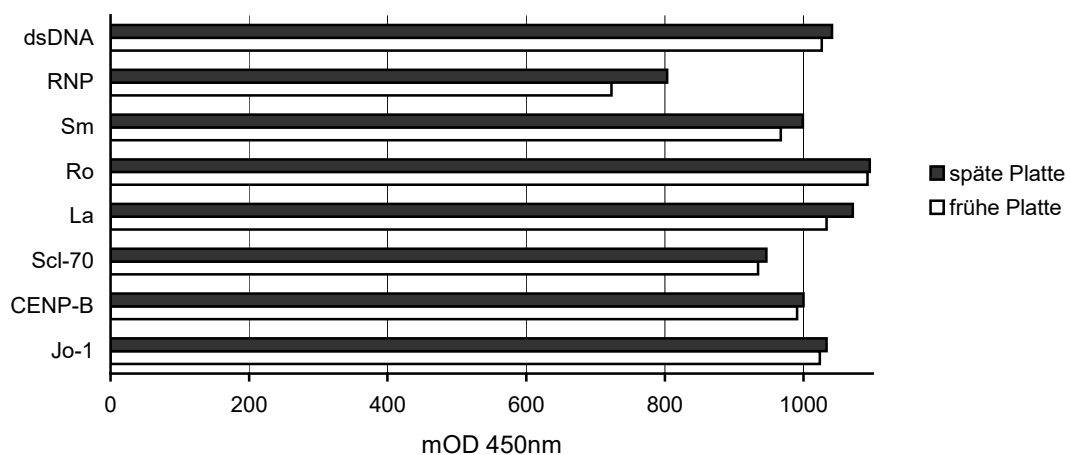
Empfohlener Meßbereich: $0,3 < \text{Ratio} < 7$

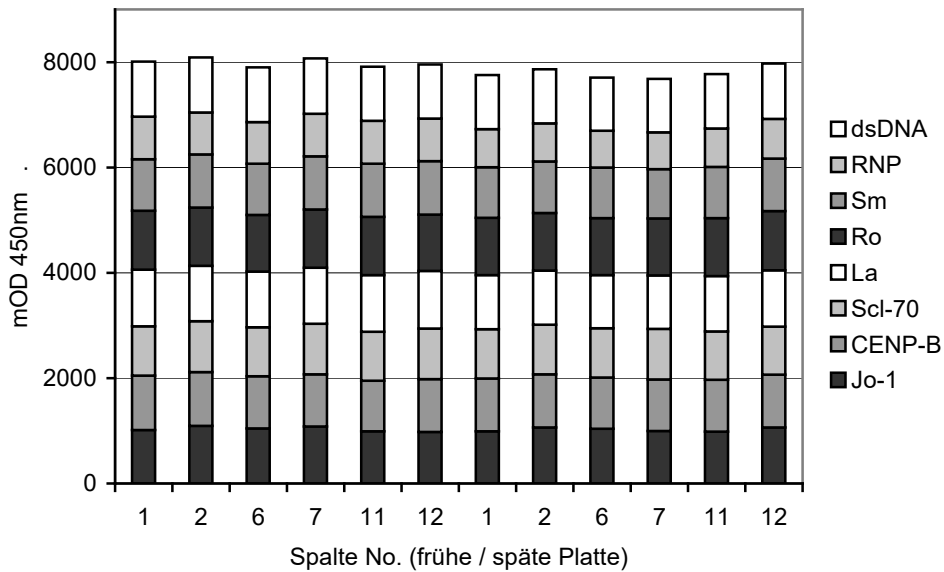
11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch Messung einer gleichförmig-positiven, aber nicht-sättigenden Probe (IgG); und zwar 3 (ausgewählte Platten) x 8 (Zeilen) x 12 (Spalten) = 288-fach.

Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK), Zeilen-weise über die Platten $< 10\%$. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 0903E).

Zeile	Platte	früh (n/10)							spät (9n/10)							MW	VK %
		Spalte	1	2	6	7	11	12	MW	1	2	6	7	11	12		
A	dsDNA	1041	1049	1043	1055	1031	1030	1042	1026	1026	1005	1019	1031	1051	1026	1034	1,4
B	RNP	809	797	786	806	814	807	803	726	726	702	695	730	758	723	763	5,9
C	Sm	982	1007	973	1010	1007	1016	999	961	975	959	940	973	996	967	983	2,4
D	Ro	1116	1105	1075	1104	1107	1067	1096	1085	1096	1078	1079	1098	1121	1093	1094	1,6
E	La	1078	1054	1057	1065	1077	1096	1071	1028	1029	1010	1014	1049	1070	1033	1052	2,6
F	Scl-70	935	962	933	960	928	961	947	934	942	940	959	918	913	934	940	1,8
G	CENP-B	1029	1026	992	994	961	998	1000	1004	1006	971	978	987	1000	991	996	2,0
H	Jo-1	1017	1091	1043	1079	990	981	1034	992	1064	1038	999	984	1066	1024	1029	3,9
Summe / MW		8007	8091	7902	8073	7915	7956	7991	7756	7864	7703	7683	7770	7975	7792	7891	2,7

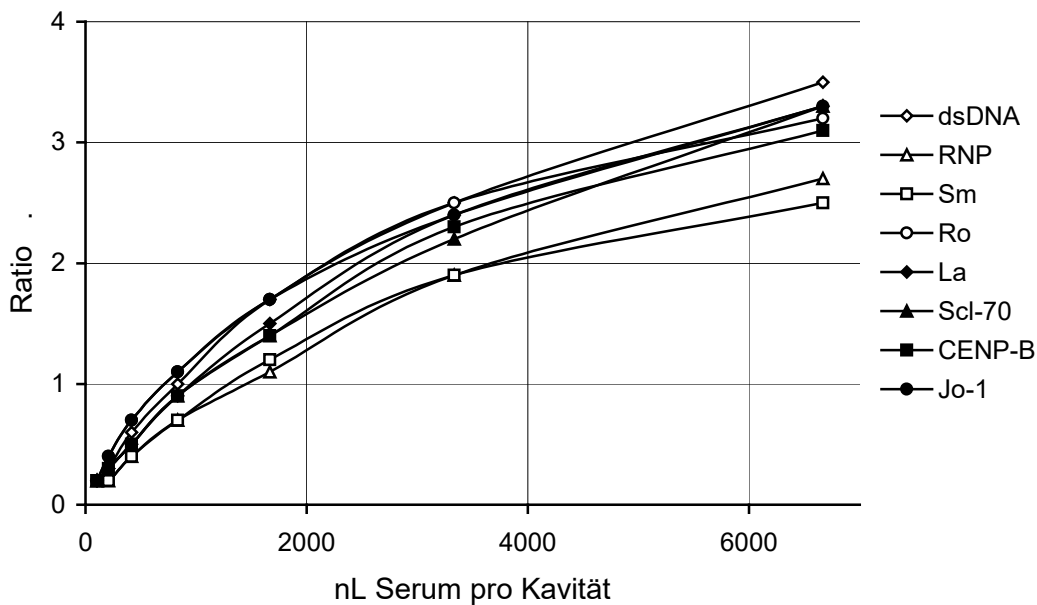




17111FE00.FED/FphHom

11.5. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um diese Eigenschaft des ELISAs zu bestimmen, wurden individuelle Seren zu Pools mit gleichförmiger Reaktivität gegenüber allen 8 Antigenen vereinigt und 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.



17111FE00.FED/Linear

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. Die Werte für Ratio und Variabilitäts-Koeffizienten (VK) sind über alle 8 Antigene gemittelt.

a. Intra- und Inter-Assay Variabilität (n pro Parameter = 3 bzw. 9)

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)	
		intra-Assay	inter-Assay
1	1,2	3,7	4,5
2	1,9	1,5	2,4
3	2,9	1,5	2,0

b. Operator-zu-Operator Variabilität (n pro Parameter = 2)

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

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

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1,1	5,3
2	1,8	3,3
3	2,8	6,0

11.7. Häufigkeits-Verteilung der verschiedenen ANA (IgG)

a. In einem Normalkollektiv

Dies wurde analysiert mit einem Serenkollektiv von Blutspendern, gleichmäßig nach Geschlecht und Alter verteilt. Folgende Verteilung der Analyte wurde beobachtet (angegeben in Ratio-Werten; s = Standardabweichung):

Parameter	Anzahl Seren	Mittel (MW)	MW + s	MW + 2s	Median	95. Perzentile	diagnost. Spezifität
dsDNA	80	0,28	0,51	0,75	0,21	0,63	98 %
RNP	80	0,32	0,45	0,57	0,29	0,55	100 %
Sm	80	0,18	0,21	0,23	0,18	0,22	100 %
SS-A/Ro	80	0,25	0,30	0,35	0,25	0,33	100 %
SS-B/La	160	0,16	0,27	0,39	0,13	0,31	100 %
Scl-70	80	0,40	0,61	0,83	0,33	0,72	98 %
CENP-B	80	0,25	0,33	0,41	0,23	0,38	100 %
Jo-1	80	0,28	0,40	0,51	0,25	0,43	99 %

b. In positiven Kollektiven

In 8 Kollektiven positiver Seren wurde die folgende Verteilung der jeweiligen Autoantikörper ermittelt (angegeben in Ratio-Werten). Die untersuchten Seren waren zuvor mit unabhängigen Methoden (bspw. in monospezifischen, CE-konformen ELISAs, durch Immunfluoreszenz) und/oder in verschiedenen Ringversuchen positiv gefunden worden oder waren klinisch definiert.

Parameter	Anzahl Seren	Mittel (MW)	MW - s	MW - 2s	Median	5. Perzentile	diagnost. Sensitivität
dsDNA	11	2,5	1,2	< 0	2,2	1,0	91 %
RNP	14	5,5	3,9	2,2	6,4	2,9	100 %
Sm	12	4,0	2,9	1,8	4,4	2,0	100 %
SS-A/Ro	17	4,9	4,0	3,1	5,3	3,6	100 %
SS-B/La	31	39	< 0	< 0	10,4	1,5	100 %
Scl-70	10	4,5	3,3	2,0	4,7	2,5	100 %
CENP-B	11	4,6	3,6	2,6	4,8	3,1	100 %
Jo-1	6	6,1	5,7	5,4	6,1	5,4	100 %

Die angegebenen Werte für die diagnostische Spezifität und Sensitivität des ELISAs gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

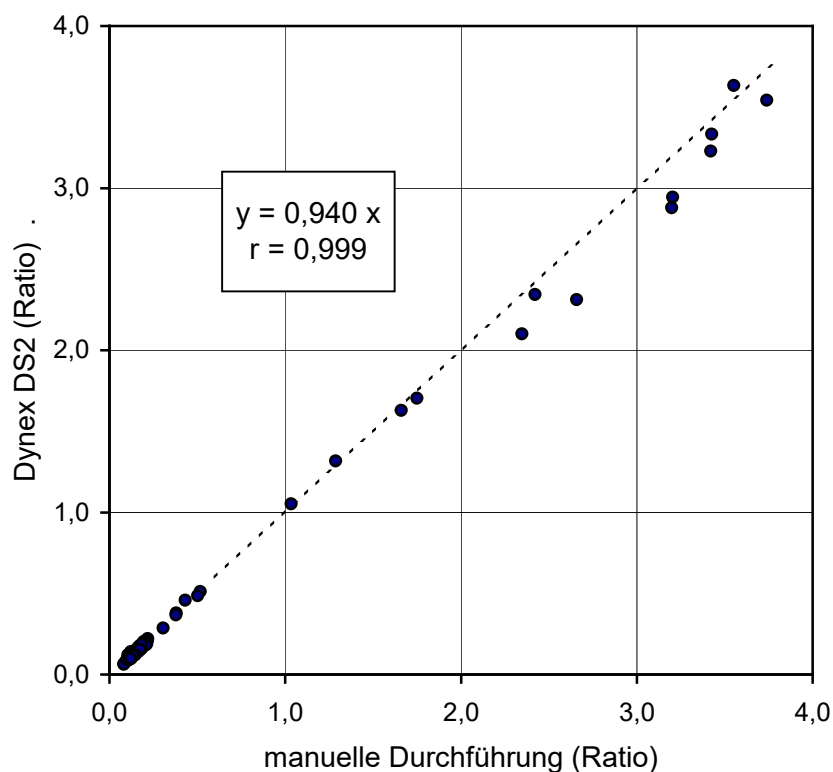
11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System

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

automatischen DS2 ELISA System (die VK-Werte sind über alle 8 Antigene gemittelt):

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n pro Parameter = 3)	mittl. VK = 1,4 %	mittl. VK = 1,3 %
inter-Assay Variabilität (n pro Parameter = 9)	mittl. VK = 1,6 %	mittl. VK = 2,0 %

Korrelation: Um diese Eigenschaft des ANA Profile 8 ELISAs zu ermitteln, wurden 10 CDC-Seren (vgl. Abschnitt 11.2) passend verdünnt und auf allen 8 Antigenen mit beiden Methoden gemessen; Resultat:



1711FE00.FED/Korr/DynexDS2

12. Garantie und Haftung

Steffens biotechnische Analysen GmbH (SBA) 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 SBA jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann SBA keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13. Symbole



Artikel-Bezeichnung



Chargen-Bezeichnung



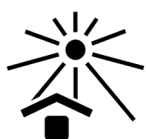
Enthält x Bestimmungen



Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

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 Proben 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. 8 x 100 μL der Kontrollen (3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben jeweils in die Kavitäten einer Spalte dispensieren. 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 (für jeden Parameter separat durchzuführen): Die cut-off-Absorption ermitteln, indem die jeweilige Absorption der positiven Kontrolle mit dem zugehörigen Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann den Ratio-Werte der Probe berechnen, indem ihre jeweilige Absorption durch die korrespondierende cut-off-Absorption dividiert wird (8 Ratio-Werte pro Probe).