

ELISA
zur Bestimmung von
Autoantikörpern gegen
Centromer-Protein B
(CENP-B)

Gebrauchsinformation

REF

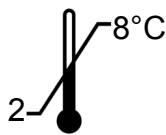
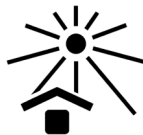
1511FE00.FWD



12 x 8 Bestimmungen

IVD

CE



STEFFENS BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Gewerbestr. 7

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. Linearität
 - 11.6. Präzision
 - 11.7. Häufigkeitsverteilung von CENP-B 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: 1511FE30.FWD.doc / 2019-08-07

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-Syndrome mit anderen systemisch-entzündlichen Krankheiten (1).

Gegen Scl-70 (Skleroderma-assoziiertes 70 kDa-Antigen) gerichtete Autoantikörper gelten als verlässlicher Marker der PSS mit einer Spezifität > 90 % (2). Sie zeigen ihre schwere Verlaufsform (diffuse PSS) an, meist mit Manifestierung an Lunge, Niere oder Herz.

Dagegen zeigen Patienten mit dem sog. CREST-Syndrom, der milderen, kutanen Form der PSS mit verlangsamtem Verlauf, selten Scl-70 Autoantikörper (3). Für dieses Syndrom haben sich Autoantikörper als wertvolle Marker erwiesen, die sich gegen Antigene des chromosomalen Centromers richten (ACA) (4). Sie erkennen eine Familie von Proteinen, die während des gesamten Zellzyklus im Centromer-Bereich eukaryotischer Zellen verbleiben. Unter den Haupt-Proteinantigenen (namens CENP-A, CENP-B und CENP-C) ist CENP-B besonders nützlich, da fast alle ACA-positive Seren ein bestimmtes, Carboxy-terminales Fragment dieses Proteins erkennen (4).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, IgG-Antikörper in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) quantitativ oder qualitativ zu messen, die gegen CENP gerichtet sind. Das verwendete Antigen ist ein hochgereinigtes, rekombinantes Präparat humanen-CENP-B's, exprimiert in Baculovirus-infizierten Insektenzellen. 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. 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 Probenpuffer, Standards und Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und

Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H_2SO_4), 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 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, 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 beschichtet mit CENP-B Antigen. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: CENP-B-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 CENP-B IgG in der Probe wider.

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit CENP-B 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 CENP-B 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.

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

- 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. 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-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.

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

Die Proben mit üblicher Labortechnik präparieren. Trübe Proben müssen zunächst geklärt (zentrifugiert) werden. Die klaren oder geklärten 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, Standards, 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. Aufgetaute 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. 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.

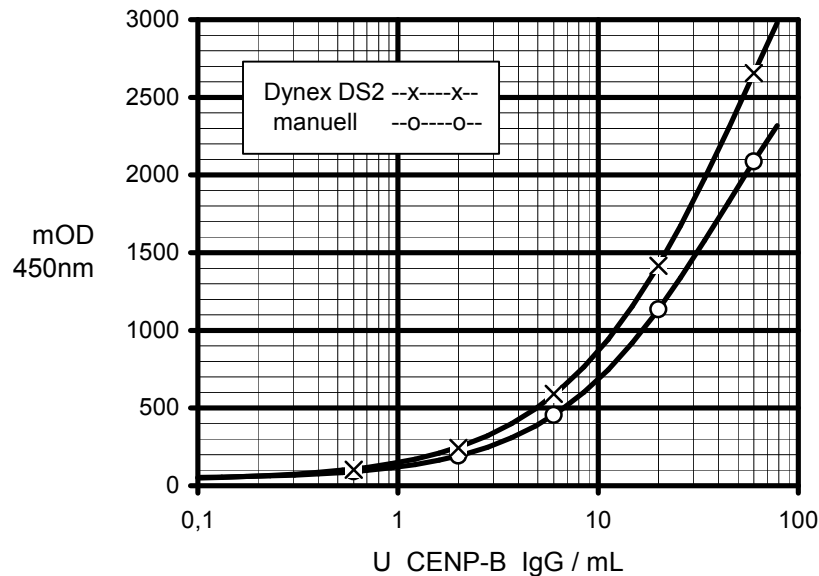
8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine 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

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.



1511FE00.FED/StdKurveV2312J

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 CENP-B IgG / mL Probe).

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. Diese errechnet sich folgendermaßen:

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

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

Absorptionpositive 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 CENP-B IgG ist, kann man ihre Ratio berechnen, 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 jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargenspezifischen 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 CENP-B IgG / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 3,2	< 0,84
cut-off	4,0	1,00
grenzwertiger Bereich	3,2 - 5,0	0,84 - 1,20
positiver Bereich	> 5,0	> 1,20

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 CENP-B aufweist. Folglich ist das CREST-Syndrom eher unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen. Liegt Verdacht auf PSS vor, sollten Autoantikörper gegen Scl-70 überprüft werden.

Wegen der hohen diagnostischen Spezifität der CENP-B Autoantikörper sollte ein positives Resultat als Hinweis auf das CREST-Syndrom interpretiert werden. Der Test sollte jedoch mindestens zweimal positiv ausfallen, getrennt durch mehrere Wochen. Allerdings kommen ACA vereinzelt auch bei anderen Krankheiten vor, u.a. bei rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes, primärem Sjögren-Syndrom und primärer biliärer Zirrhose (4).

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 CENP-B 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/mL) angegeben, da kein internationaler Standard verfügbar ist.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen CENP-B 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)	0,7	0,3	0,5	0,3	1,6	0,3	0,5	38	0,6	0,3

11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

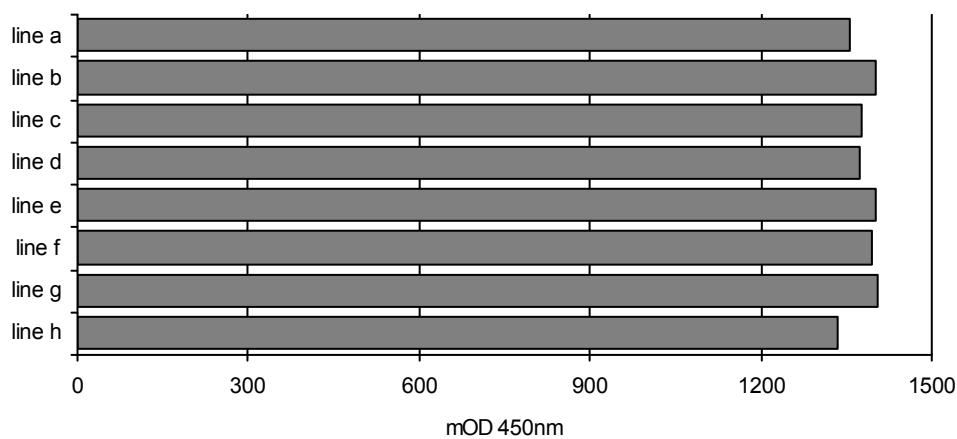
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu $< 0,2$ U CENP-B IgG / mL Probe bestimmt (n = 24).

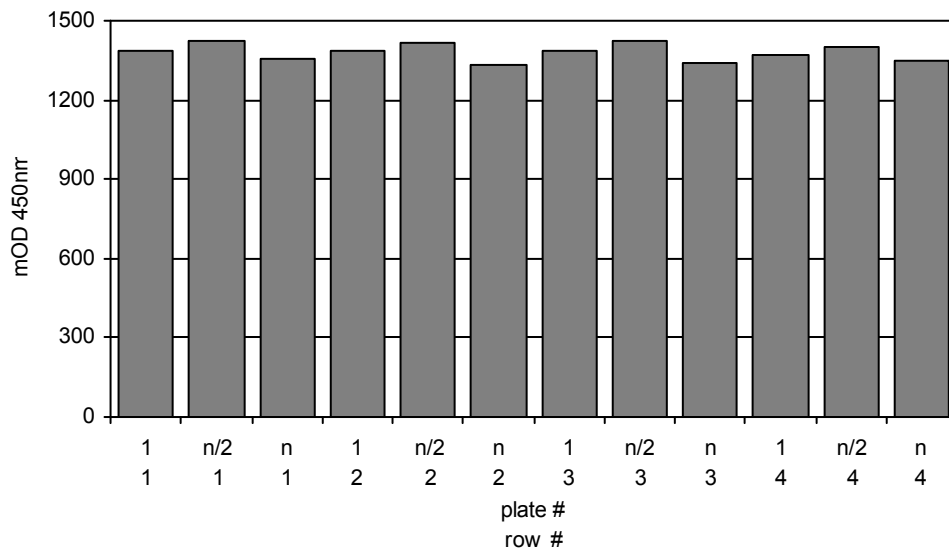
Empfohlener Messbereich: 0,5 - 60 U/mL.

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: 2708R).

plate row	1 1	n/2 1	n 1	1 2	n/2 2	n 2	1 3	n/2 3	n 3	1 4	n/2 4	n 4	mean	cv %
line a	1365	1433	1350	1366	1408	1297	1330	1413	1305	1320	1384	1311	1357	3,4
line b	1408	1440	1366	1392	1429	1365	1399	1440	1385	1399	1443	1372	1403	2,1
line c	1381	1413	1341	1385	1421	1340	1392	1435	1316	1355	1386	1352	1376	2,6
line d	1385	1437	1354	1387	1400	1321	1374	1431	1335	1363	1384	1321	1374	2,8
line e	1412	1430	1372	1392	1423	1365	1413	1445	1365	1410	1429	1383	1403	1,9
line f	1410	1416	1343	1389	1412	1358	1413	1431	1359	1416	1429	1372	1396	2,2
line g	1395	1434	1373	1411	1431	1356	1442	1439	1367	1400	1444	1388	1407	2,2
line h	1309	1394	1322	1376	1421	1283	1315	1348	1324	1293	1337	1287	1334	3,3
mean	1383	1425	1353	1387	1418	1336	1385	1423	1345	1370	1405	1348	1381	
cv %	2,5	1,1	1,3	0,9	0,8	2,4	3,1	2,2	2,1	3,3	2,7	2,8		3,1

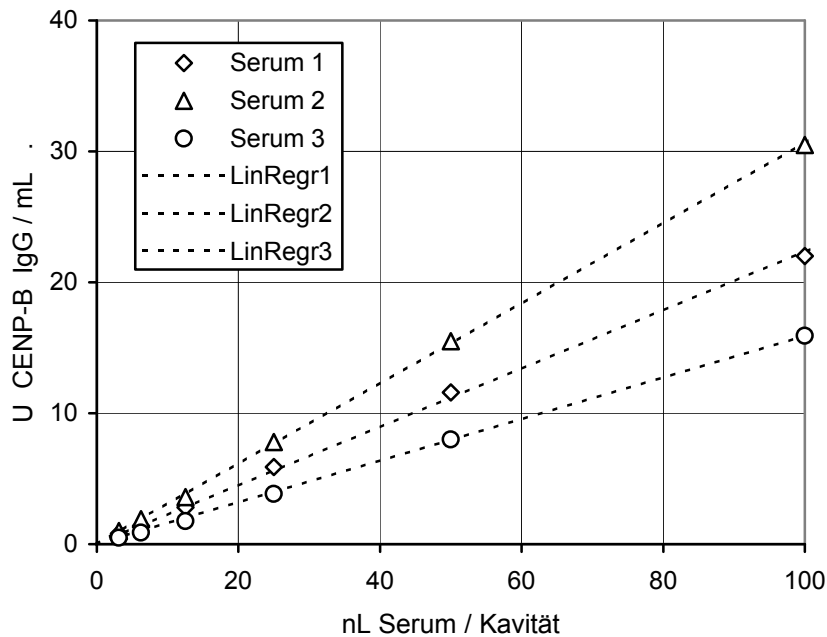




1511FE00.FED/2708R

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.



1511FE00.FED/LinearV2312J

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	5,7	1,7	2,1
2	10	3,6	4,7
3	28	3,2	4,3

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

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	6,0	2,4
2	11	3,1
3	29	1,7

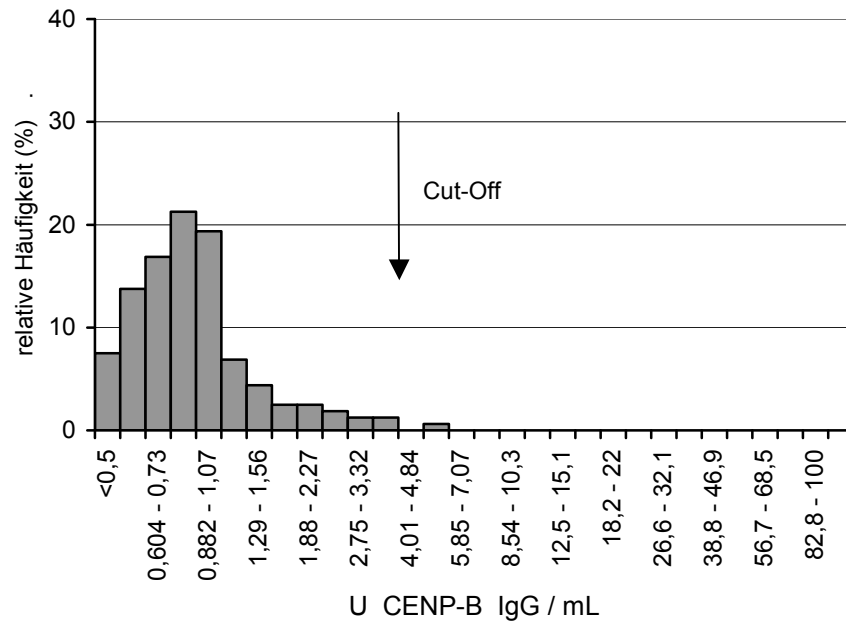
c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	6,2	5,0
2	11	8,6
3	30	6,8

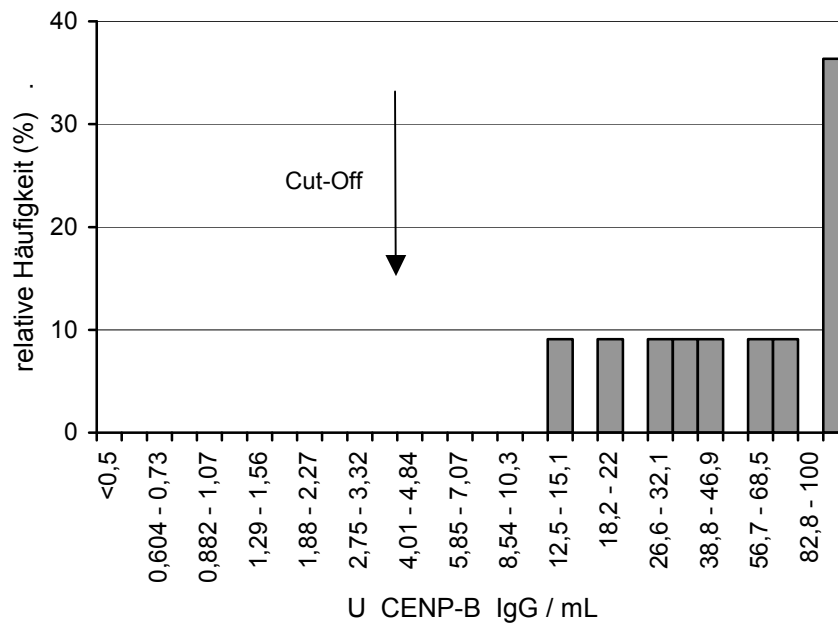
11.7. Häufigkeitsverteilung von CENP-B IgG

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 IgG-Autoantikörper gegen CENP-B positiv gefunden worden oder klinisch definiert waren. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

Blutspender-Seren



Positiv-Seren



1511FE00.FED/HaufgPlotV2312J

Blutspender-Seren

n:	160
MW:	1,0 U/mL
MW + s:	1,7 U/mL
MW + 2s:	2,4 U/mL
Median:	0,8 U/mL
95. Perzentile:	2,1 U/mL

positive Seren

n:	11
MW:	88 U/mL
MW - s:	15 U/mL
MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	66 U/mL
5. Perzentile:	18 U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 4,0 U/mL bestimmt (5). Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von etwa 99 bzw. 100 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen. Insbesondere wegen der geringen Anzahl an positiven Seren sollte die Sensitivität des Tests mit Vorsicht interpretiert werden.

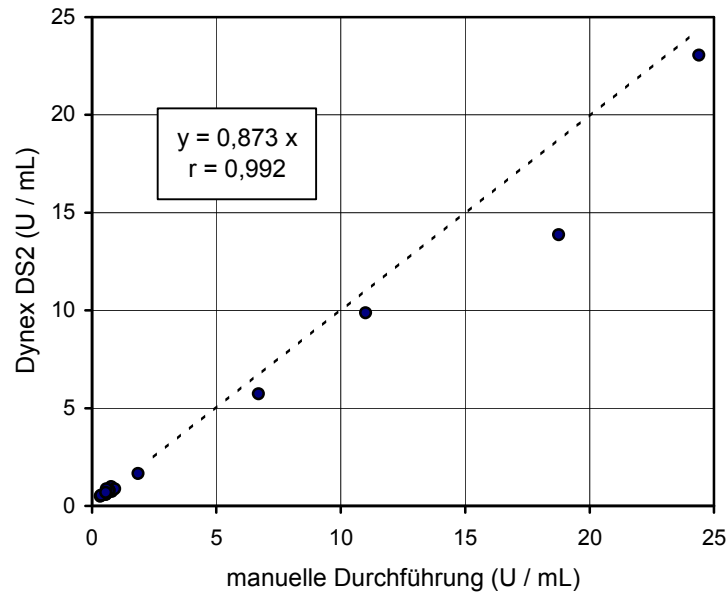
11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System

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 = 2,5 %	mittl. VK = 3,4 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 6,2 %	mittl. VK = 7,1 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



1511FE00.FED/KorrDynexDS2-V2312J

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

REF

Artikel-Bezeichnung

LOT

Chargen-Bezeichnung



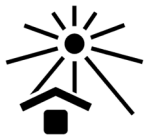
Enthält x Bestimmungen



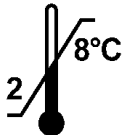
Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

14. Literatur

1. 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. 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
3. Von Mühlen, C. A., Tan, E. M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24 (1995), 323 - 358
4. McHugh, N. J.: Centromere autoantibodies. In: Shoenfeld, Y., et al. (eds): *Autoantibodies* (2007), 151 - 157, Elsevier B. V., Amsterdam
5. 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 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 μ L Waschpuffer waschen. Dann je 100 μ L 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 μ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 μ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 μ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 μ L 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/mL) 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.