

MASTAZYME™ ENA

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen
SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 oder Centromer in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection of autoantibodies to
SS-A, SS-B, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 or Centromer in serum and plasma

Gebrauchsinformation / Instructions for Use



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only



Deutsch: Seiten 03–09








English: Pages 10–15

MASTAZYME™ SS-A (Ro)	REF 733015	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ SS-B (La)	REF 733016	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Sm	REF 733013	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Sm/RNP	REF 733014	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Scl-70	REF 733012	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Jo-1	REF 733010	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Centromer	REF 733009	12 x 8 Tests

Lagerung / Storage: 2–8 °C

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:

Explanations of abbreviations and icons used on labels:

STRIPS		Mikrotiterstreifen	Microtiter strips
CONTR	+	Positive Kontrolle	Positive control
CONTR	-	Negative Kontrolle	Negative control
CAL	1-4	Kalibrator 1-4	Calibrator 1-4
CONJ		HRP-Konjugat	HRP conjugate
DIL		Probenverdünnungspuffer	Sample diluent
SUBS		TMB-Substrat	TMB substrate
STOP		Stopp-Lösung	Stopping solution
WASH	CONC	Waschpuffer, konzentriert	Washing buffer, concentrate
LOT		Charge	Batch
		Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use
		Wichtige Hinweise beachten	Important notes
		Verfallsdatum	Expiry Date
		Lagerung bei	Storage
		Reagenzien nicht zur Wiederverwendung geeignet	Reagents not reusable

	Inhalt	Seite
1.	Verwendungszweck	4
2.	Testprinzip	4
3.	Packungsinhalt	4
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	5
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
6.	Lagerung und Stabilität	6
7.	Probengewinnung und -handhabung	6
8.	Testdurchführung	6
9.	Auswertung und Interpretation	7
10.	Testcharakteristika	8
11.	Literatur	9

1. Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ ENA ELISA dient dem Nachweis von Autoantikörpern gegen die entsprechenden Autoantigene in Serum oder Plasma. MASTAZYME™ ENA ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

2. Testprinzip

Das Testprinzip der ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30-minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 N Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete elektronische Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.

3. Packungsinhalt

Das Testkit enthält genügend Reagenzien für 12 x 8 = 96 Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet jeweils spezifisch für SSA, SSB, SM, SM/RNP, Scl70, Jo-1, oder Centromer
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
4 x 1,5 mL	Kalibratoren 1–4	Stabilisiertes humanes Plasma, enthält antigenspezifische Antikörper, gebrauchsfertig

	Anti-X Konzentration [U/mL]
Kalibrator 1	1
Kalibrator 2 (Cut-off)	25
Kalibrator 3	50
Kalibrator 4	200
Positive Kontrolle	100
Negative Kontrolle	15

X = SSA, SSB, SM, SM/RNP, Scl70, Jo-1, oder Centromer

1 x 1,5 mL	Negative Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
1 x 1,5 mL	Positive Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
2 x 60 mL	Probenverdünnungspuffer	PBS Puffer mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG (Zie-ge), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	0,5 N H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
2 x 50 mL	Waschpuffer 10 x Konz.	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, evtl. vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen

4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.

- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Labogeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfalldatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden. Er muss allerdings vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Nach dem Öffnen ist das angebochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Probenverdünnungspuffer 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden.

8. Testdurchführung

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

Waschpuffer: Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 50 mL Konzentrat + 450 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MP-Streifen sollten in der Hülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

8.2. Testablauf

Hinweis: Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben, gebrauchsfertigen Kalibratoren und Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen bei RT für 15 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden, ca. 5 Minuten stehenlassen.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch anhand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

9. Auswertung und Interpretation

Qualitativ

Zur qualitativen Testauswertung wird der Kalibrator 2 verwendet. Eine Quantifizierung nur unter Verwendung des Cut-off-definierenden Kalibrators ist nicht möglich.

Quantitativ

Die Konzentration der Patientenproben wird mit gängigen Computerprogrammen berechnet. Für die Berechnung der Kalibrationskurve ist z. B. die 4-Parameter-Anpassung geeignet.

Optional: Die Extinktionswerte der 4 Kalibratoren und die entsprechenden Konzentrationen definieren die Punkte der Eichkurve. Für das Zeichnen der Eichkurve eignet sich besonders halblogarithmisches Millimeterpapier. Die Konzentration der Kalibratoren (s. Etikett bzw. QC-Zertifikat) wird auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen, die entsprechenden Extinktionswerte auf der Ordinate (y-Achse). Die Kalibrationskurve verläuft in der log-lin Auftragung sigmoid. Anhand dieser Kurve kann die Konzentration der Proben dann auf der Abszisse abgelesen werden.

Grenzwerte

Anhand klinisch definierter Proben sowie gesunder Blutspender wurden nachstehende Normal- und Grenzwerte festgelegt:

negativ: < 25 U/mL

positiv: > 25 U/mL

Interpretation der Ergebnisse

Kein Messergebnis darf für sich allein zu einer abschließenden Diagnose verwendet werden, sondern muss immer in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Befunden interpretiert werden.

SS-A

Der Test erfasst Autoantikörper gegen 60 kDa und 52 kDa SS-A-Proteine. Physiologisch sind Antikörperkinetiken bei SS-A gar nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt; in Verlaufskontrollen sind sie daher nur schwer zu erfassen. Ein Abfall der Antikörperkonzentration erfolgt u. a. bei gleichzeitiger Behandlung mit Zytostatika.

Das Antigen liegt weitgehend in einer reaktiven Konformation auf der Festphase vor. Die Konformation ist für die Sensitivität essentiell. ELISA-positive Ergebnisse lassen sich daher in einigen Immunoblots nicht bestätigen.

SS-B

Das Festphasenantigen reagiert mit Autoantikörpern, die gegen das SS-B-Gesamtprotein sowie gegen die 23 kDa- und 29 kDa-Spaltprodukte gerichtet sind. Isolierte Anti-SS-B-positive Seren sind sehr selten, meist liegen gleichzeitig auch Antikörper gegen SS-A vor.

Sm

Der Assay erfasst Antiseren, die gegen den gereinigten „Core“-Komplex des Sm-Proteins gerichtet sind. Der ELISA erfasst somit alle Sm-Antigene der Spezifität B'/B, D, E, F und G. Seren mit ausschließlicher RNP-Spezifität werden nicht mit erfasst!

Sm/RNP

Die RNP-Domänen des Sm/RNP-Komplexes erfassen solche Antikörper, die gegen regulatorisch/metabolisch funktionelle ribonucleäre Proteinpartikel gerichtet sind. An den Sm-Anteil binden Antikörper gegen den „Core“-Komplex“ und gleichermaßen auch solche, die gegen snRNP-spezifische Polypeptide gerichtet sind. Positive Testergebnisse geben einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen eines SLE oder einer Mischkollagenose.

Scl-70

Positive Testergebnisse werden fast ausschließlich bei der Sklerodermie gefunden; wesentlich seltener reagieren aber auch SLE- und Sjögren-Patienten positiv mit dem Scl-70 Antigen. Klinisch Gesunde reagieren negativ. Scl-70-Antikörpertiter können nicht für die Beurteilung der Aktivität und Prognose der Erkrankung herangezogen werden.

Jo-1

Hoch gereinigtes Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase) wird als Antigen verwendet, das sehr selektiv mit Jo-1 Antikörpern reagiert. Kreuzreaktionen können weitestgehend ausgeschlossen werden.

Centromer

Das Antigen auf der Festphase ist ein rekombinantes Centromer B Protein. Kreuzreaktionen können weitgehend ausgeschlossen werden.

10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ ENA ELISAs wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

11. Literatur

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K.Conrad, R.-L. Humbel, M.Meurer, Y.Shoenfeld, E.M.Tan, 1998, Pabst Science Publishers
3. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
4. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists; Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000).

Contents	Page
1. Intended use	11
2. Principle of the Test	11
3. Kit Contents	11
4. Materials Required but not Provided	12
5. Warnings and Precautions	12
6. Storage and Stability	13
7. Specimen Collection and Handling	13
8. Assay Procedure	13
9. Results and Interpretation	14
10. Assay Performance	15
11. References	15

1. Intended use

MASTAZYME™ ENA ELISA has been designed for the detection and quantification of specific antibodies against ENA respectively in serum and plasma.

This assay is intended for *in-vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other findings. Clinical judgement and additional tests should also be taken into account.

2. Principle of the Test

The ELISA test can be described in four stages:

2.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to antigen on the solid phase to form a stable immune complex. After incubation for 30 minutes at room temperature the wells are washed with a prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

2.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After incubating for 30 minutes at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with wash buffer.

2.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and consequent colour development is stopped after a 15 minute incubation at room temperature by adding 0.5 N H₂SO₄ to the wells. The shift in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

2.4 Reading and interpretation

The colour intensity is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

The results can be read from a calibration curve or with an electronic graphing package using a 4 parameter sigmoidal curve.

3. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. Kit components should be stored at 2–8 °C. The expiry date is shown on the individual labels.

12	Microtiter strips	Single strips each with 8 break-apart wells each coated with purified SSA, SSB, SM, SM/RNP, Scl70, Jo-1, or Centromer respectively
1 x	Frame holder	
4 x 1.5 mL	Calibrators 1–4	Stabilized human plasma containing antibodies against the above antigens and pre-diluted in buffer. Ready to use (RTU).

	Anti-X concentration [U/mL]
Calibrator 1	1
Calibrator 2 (Cut-off)	25
Calibrator 3	50
Calibrator 4	200
Positive Control	100
Negative Control	15

X = SSA, SSB, SM, SM/RNP, ScI70, Jo-1 or Centromer

1 x 1.5 mL	Negative control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
1 x 1.5 mL	Positive control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
2 x 60 mL	Sample diluent	PBS solution with preservative, ready to use.
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready to use.
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use.
1 x 12 mL	Stopping solution	0.5 N sulfuric acid, ready to use.
2 x 50 mL	Wash buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10x concentrated. To be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to dissolve any crystals

4. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micropipettes and a multichannel pipette (optional).
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter plate washer (if washing manually: wash bottle)
- Reagent tubes for serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of similar or better quality

5. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera, plasma and buffers containing human biological material were found to be negative for Hepatitis B, C and HIV. Nevertheless, precautions such as the use of latex gloves must be taken.
- Serum and reagent spills should be cleaned with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and the refuse disposed of appropriately.
- All reagents should be brought to room temperature (18 to 24 °C) before starting the test procedure.
- Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly by gentle agitation. Vigorous shaking leading to formation of foam should be avoided.
- It is important to pipette with constant time intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same reaction conditions.
- When pipetting reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Furthermore, disposable pipette tips are strongly recommended to avoid cross-contamination. The contents of the bottles are usually sensitive to oxidation so should be opened only for a short time.
- To avoid cross contamination single use pipet tips should be used
- No reagents from different kit batches should be used and reagents should not be mixed with one another.

- All reagents should be used within the listed shelf life.
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or measurement (ELISA Reader) instrumentation.
- Certain reagents (especially the stop solution and substrate) are irritants- avoid contact with skin, eyes and mucosal membranes. In case of accident, rinse with water and seek medical attention. Clean all equipment after use to avoid secondary contact incidents.

6. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted wash buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C. However ensure that this is at room temperature before testing.

Kits should be used within three months of opening.

7. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for testing. Samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days, although for longer storage periods they should be aliquoted and kept at -20 °C. Repeated freezing and thawing is contra-indicated. Lipaemic, haemolytic, icteric and bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera should be prediluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

8. Assay Procedure

8.1. Preparation of Reagents

Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.

Washing buffer: Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. The user takes sole responsibility for any modifications to the test procedure.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard calibration curve should be established with each assay for quantitative results.
- Replace any unused microtiter strips in the resealable aluminium bag provided and store under dry conditions at 2–8 °C.

8.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the calibrators, controls and samples.

Note: Other incubation conditions are possible. However in case of modifications to the recommended test procedure (e.g. an incubation temperature of 37 °C instead of RT) assay performance should be validated by the user.

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators and controls into the appropriate wells.

2. Incubate the test plate at room temperature for 30 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the test plate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
7. Pipette 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Incubate for 15 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended. Concentrations can be plotted with an electronic graphing package or by hand against the calibration curve.

The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

9. Results and Interpretation

Qualitative

Calibrator 2 is used for qualitative interpretation of the assays, depending on specificity requirements to include or eliminate borderline results. A quantitative interpretation is not possible when only using calibrator 2 alone.

Quantitative

The results can be calculated using a computer and suitable software program. In this case the results are calculated using a 4 parameter fit algorithm to produce a sigmoidal curve.

Optional: A standard curve is plotted by entering the mean absorbance of each calibrator on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using either log/log or linear/log graph paper. The concentration of the controls and specimen can then be read directly from the graph.

Suggested normal values

In a normal range study using serum samples from healthy blood donors and disease-state sera the following normal and elevated ranges have been established. It is recommended that each laboratory should establish its individual normal ranges based on results obtained from the local population.

negative: < 25 U/mL

positive: > 25 U/mL

Interpretation

Results can be affected by several patient factors. Clinical diagnosis and disease prognosis should not be based on a single test result. Other lab data and clinical observations must be taken into consideration before a conclusive diagnosis can be made.

SS-A

Autoantibodies directed against SS-A 60 kDa and 52 kDa proteins are giving positive results. Kinetic variations of antibodies are usually not of physiological importance as a decline of antibody titers might be due to treatment with cytostatic drugs.

After coating the antigen retains its native conformational protein structure essential for specific antibody binding. Immunoblot techniques may not necessarily be able to confirm ELISA positive results.

SS-B

MASTAZYME™ SS-B detects antibodies directed against SS-B protein as well as degradation products of 23 kDa and 29 kDa size. Anti SS-B positive sera totally lacking anti SS-A antibodies are very rare.

Sm

A positive result is due to antibodies directed against Sm core complex including the specific antigens B'/B, D, E, F and G. The antigen on the solid phase is free of RNP protein!

Sm/RNP

Sm/RNP detects antibodies directed against regulatory or metabolic functional ribonuclear particles. The antigen binds antibodies to Sm core as well. Positive results are highly predictive for SLE or MCTD.

Scl-70

Positive results are highly predictive for scleroderma; only few SLE and Sjögren patients react positive with Scl-70. Normal healthy blood donors hardly give positive results in a Scl-70 ELISA. Scl-70 antibody titers should not serve as a criterion for activity and prognosis of the disease.

Jo-1

MASTAZYME™ Jo-1 solid phase is coated with a highly purified isolate of histidyl-tRNA-synthetase antigen which is very selective for anti-Jo-1 antibodies. Almost any cross-reactivity can be ruled out!

Centromere

CENP B proteins are coated onto the MASTAZYME™ Centromer solid phase. The antigen is very selective for anti-Centromere antibodies.

10. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ ENA ELISAs have been established and assessed according the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

11. References

1. Autoantibodies, Eds. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996, Elsevier
2. Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies, Eds. K.Conrad, R.-L. Humbel, M.Meurer, Y.Shoenfeld, E.M.Tan, 1998, Pabst Science Publishers
3. Autoantikörper, K.Conrad, 1998, Pabst Science Publishers
4. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists; Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA, Arch. Pathol. Lab. Med., 124 (1), 71-81 (2000).

United Kingdom

**Mast Group Ltd.
MAST House Derby Road,
Bootle, Mersey Side L20 1EA**

**Tel.: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
sales@mastgrp.com**



Deutschland

**Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DÉ 23858 Reinfeld**

**Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
mast@mast-diagnostica.de**

France

**Mast Diagnostic
115, Rue Jules Barni
CS 91106
80011 AMIENS CEDEX 1
Tel.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
info@mast-diagnostic.fr**

www.mastgrp.com