

MASTAZYME™ ENA

MASTAZYME™ SS-A (Ro)	REF 733015 UDI-DI 4250729700293	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ SS-B (La)	REF 733016 UDI-DI 4250729700309	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Sm	REF 733013 UDI-DI 4250729700279	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Sm/RNP	REF 733014 UDI-DI 4250729700286	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Scl-70	REF 733012 UDI-DI 4250729700262	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Jo-1	REF 733010 UDI-DI 4250729700255	12 x 8 Tests
MASTAZYME™ Centromer	REF 733009 UDI-DI 4250729700248	12 x 8 Tests

Gebrauchsanweisung / Instructions for Use /

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only**



Deutsch

English

Seiten

Pages

02–05

06–09

MASTAZYME™ ENA

Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ ENA ist ein Enzymimmunoassay für den Nachweis und die Semi-Quantifizierung spezifischer Autoantikörper gegen SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, Centromer in Humanserum und -plasma, die bei der Analyse von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

Der Assay eignet sich für den manuellen oder automatisierten Einsatz auf offenen EIA-Prozessorsystemen und ist ausschließlich für die professionelle In-vitro-Diagnostik bestimmt. Alle Labortestergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen Daten interpretiert werden. Die klinische Beurteilung und weitere Tests müssen berücksichtigt werden.

Wichtiger Hinweis zur Gebrauchsanweisung

Bei etwaigen Assay-relevanten Änderungen der Gebrauchsanweisung wird das auf der letzten Seite stehende Versionsdatum aktualisiert. Für einen Zeitraum von 3 Monaten nach Vergabe der neuen Versionsnummer werden die Änderungen auf einem farbigen Beiblatt gekennzeichnet. Bitte stellen Sie sicher, dass Sie immer mit der aktuellen Gebrauchsanweisung arbeiten.

Testprinzip

Das Testprinzip der ELISAs kann in vier Schritten beschrieben werden.

Seruminkubation

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

Konjugatinkubation

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

Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,25 M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

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 o.ä.) ermittelt werden.

Packungsinhalt

- STRIPS Mikrotiterstreifen**
12 Mikrotiterstreifen in einer Halterung mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit dem jeweiligen Assay-spezifischen Antigen.
- CONTROL+ Positivkontrolle**
1 x 1,5 mL stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Eichkurve integriert werden, enthält Proclin (< 0,1 %), potenziell infektiös (siehe Warnhinweise)
- CONTROL- Negativkontrolle**
1 x 1,5 mL stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Eichkurve integriert werden, enthält Proclin (< 0,1 %), potenziell infektiös (siehe Warnhinweise)
- CAL 1-4 Kalibratoren 1-4**
4 x 1,5 mL stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, enthält antigenspezifische Antikörper, enthält Proclin (< 0,1 %), potenziell infektiös (siehe Warnhinweise)

	Anti-X Konzentration [U/mL]
Kalibrator 1	1
Kalibrator 2 (Cut-off)	25
Kalibrator 3	50
Kalibrator 4	200
Positivkontrolle *	100
Negativkontrolle *	15

* Für die chargenspezifische Konzentration siehe QC-Dokument.

- DIL Diluent**
2 x 60 mL Probendiluent, gebrauchsfertig, enthält Proclin (< 0,1 %)
- CONJ G Enzymkonjugat**
1 x 12 mL Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig
- SUBS TMB-Substrat**
1 x 12 mL 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
- STOP Stopplösung**
1 x 12 mL 0,25 M H₂SO₄ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig

9. **WASH** **CONC** Waschpuffer 10 x konz.

2 x 50 mL Waschpuffer, vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen, evtl. vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen.

Weitere verwendete Abkürzungen

1. **RTU** gebrauchsfertig

Zusätzlich benötigte Materialien

1. 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten.
2. Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm).
3. Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche).
4. Röhrchen für Serumverdünnungen.
5. Messzylinder.
6. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Warnhinweise

1. Halten Sie die allgemeinen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien für die Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien ein. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und benutzen Sie geeignete Laboreinrichtungen.
2. Vermeiden Sie Kreuzkontaminationen, sowie den Austausch der Flaschendeckel. Verwenden Sie keine kontaminierten Reagenzien. Reagenzien mit beschädigten Flaschen oder Verpackungen sollten aufgrund des Kontaminationsrisikos nicht verwendet werden. Für jede Probe oder jedes Reagenz sollte eine eigene Pipette bzw. Pipettenspitze verwendet werden.
3. Die Kontroll-/Kalibriermaterialien menschlichen Ursprungs wurden auf Antikörper gegen HIV und HBsAg getestet und wurden für negativ befunden. Sie sollten jedoch als potenziell infektiöses Material behandelt werden, das in der Lage ist, Krankheiten zu übertragen. Es wird nicht garantiert, dass die Proben frei von Infektionen oder mikrobieller Kontamination sind.
4. Einzelne Kitreagenzien enthalten bovine Komponenten. Zum Schutz vor Infektionen mit Prionen oder zoonotischen Erregern müssen die gängigen Arbeitsschutzregeln (GLP) eingehalten werden.
5. Keine hämolysierten, lipämische oder ikterischen Proben verwenden (Ref. 5, 6, 7).
6. Bestimmte Reagenzien sind reizend, insbesondere die Stopplösung und das TMB-Substrat. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Im Falle eines Unfalls mit Wasser abspülen und einen Arzt aufsuchen. Reinigen Sie alle Geräte nach dem Gebrauch, um Sekundärkontakte zu vermeiden.

7. Proclin wird wie angegeben als Konservierungsmittel verwendet. Es kann bei Verschlucken giftig sein. Stets mit reichlich Wasser in den Abfluss spülen, um es zu entsorgen.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Ändern Sie das Verfahren nicht ohne vorherige Validierung.
2. Keine Kitreagenzien nach dem Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
3. Keine Kitreagenzien aus verschiedenen Chargen kombinieren.
4. Verwenden Sie nach Möglichkeit Einweg-Plastikmaterial. Wiederverwendbare Glasmaterialien sollten vor dem Gebrauch gründlich gewaschen und frei von Reinigungsmitteln gespült werden.
5. Für jeden Pipettierschritt ist eine neue Pipettenspitze zu verwenden.
6. Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-24 °C) gebracht werden.
7. Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien gründlich gemischt werden. Kräftiges Schütteln, das zu Schaumbildung führt, sollte vermieden werden.
8. Es ist wichtig, in konstanten Zeitabständen zu pipettieren, damit in allen Vertiefungen der Mikrotiterplatte die gleichen Reaktionsbedingungen herrschen.
9. Nur Laborwasser von höchster Qualität verwenden (z. B. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua iniectionis, HPLC Grade).
10. Im Einklang mit der Guten Laborpraxis (GLP) sollten alle Laborgeräte regelmäßig auf ihre Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies gilt z. B. für Mikroliterpipetten und Wasch- oder ELISA-Reader-Geräte.

Entsorgung

Kitreagenzien, Proben und kontaminierte Einwegartikel sollten gemäß den einschlägigen Entsorgungsrichtlinien und -vorschriften für infektiöses Material entsorgt werden.

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 angebrochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

Probenmaterial

Es kann sowohl Serum als auch Plasma zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung die 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, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben (Lit. 5, 6, 7).

Testdurchführung

1. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

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

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

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

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

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- 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 Mikrotiterstreifen sollten in der wiederverschließbaren Alu-Verpackung bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

2. Testablauf

Die benötigte Anzahl an Mikrotiterwells für Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten.

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 Verifizierung 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.
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.

Auswertung und Interpretation

Qualitativ

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

Quantitativ

Die Konzentration in Patientenproben wird mit gängigen Computerprogrammen berechnet. Für die Berechnung der sigmoiden 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 loglin Auftragung sigmoid. Anhand dieser Kurve kann die Konzentration der Proben dann auf der Abszisse abgelesen werden.

Normal-/ Grenzwerte

Anhand klinisch definierter Proben sowie gesunder Blutspender wurden nachstehende Normal- und Grenzwerte festgelegt. Es wird jedem Labor empfohlen, die eigenen Normwerte auf der Grundlage der von der lokalen Bevölkerung erhaltenen Ergebnisse festzulegen:

Negativ: < 25 U/mL

Positiv: > 25 U/mL

Interpretation der Ergebnisse

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, dass 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.

Leistungsdaten

Klinische Performance

Zum Nachweis der klinischen Leistungsfähigkeit wurden klinische Proben (Serum und Plasma) getestet. Auf der Grundlage dieser Proben wurden die folgenden klinischen Leistungsparameter berechnet.

	Formel
Diagnostische Sensitivität	$\frac{TP}{(TP + FN)}$
Diagnostische Spezifität	$\frac{TN}{(TN + FP)}$
Positiver Prädiktiver Wert (PPV)	$\frac{TP}{(TP + FP)}$

Negativer Prädiktiver Wert (NPV)	$\frac{TN}{(TN + FN)}$
Effizienz	$\frac{(TP + TN)}{total}$
Positive Likelihood Ratio (PLR)	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$
Negative Likelihood Ratio (NLR)	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$

(Abkürzungen: TP: Richtig Positiv, TN: Richtig Negativ, FN: Falsch Negativ, FP: Falsch Positiv)

	Sens	Spec	PPV	NPV	Eff.	PLR	NLR
SS-A	97.6%	99.0%	99.1%	98.1%	98.4%	>10	<0.1
SS-B	91.0%	99.3%	96.8%	97.9%	97.7%	>10	<0.1
Sm	92.9%	>99%	96.3%	99.1%	98.8%	>10	<0.1
Sm/RNP	96.3%	98.5%	98.1%	97.0%	97.5%	>10	<0.1
Scl-70	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	>10	<0.1
Jo-1	>99%	98.1%	85.7%	>99%	98.3%	>10	<0.1
CENP	92.1%	90.3%	92.1%	90.3%	91.3%	9.52	<0.1

(Abkürzungen: PPV: Positiver Prädiktiver Wert, NPV: Negativer Prädiktiver Wert, PLR: Positive Likelihood Ratio, NLR: Negative Likelihood Ratio, CENP: Centromer)

Präzision

Die Wiederholbarkeit wurde an einer Charge mit mindestens zwei verschiedenen Parametern über mehrere Messtermine hinweg nachgewiesen.

Die Reproduzierbarkeit wurde an mehreren Chargen über mehrere Messzeitpunkte nachgewiesen.

Meldung schwerwiegender Vorkommnisse

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder Patient niedergelassen ist, gemeldet werden.

Referenzen

Die Referenzen finden Sie am Ende der Gebrauchsanweisung.

MASTAZYME™ ENA

Intended Purpose

The MASTAZYME™ ENA is an enzyme immunoassay for the detection and semi-quantification of specific autoantibodies against either SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, Centromer in human serum and plasma, used in the analysis of autoimmune diseases.

The assay is suitable for manual or automated use on open EIA processor systems and is intended for professional in vitro diagnostic use only. All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account.

Important Note for Use of these Kit Instructions

Any assay relevant changes to the kit instructions for use (IFU) will lead to a change of the version number at the bottom on the last page. All changes made will be identified on a separate sheet added to the IFU for a period of three months from the date of a change of the version. Please ensure that the latest version of the IFU is used for the assay procedure.

Principle of the Test

The ELISA test can be described in four stages:

Serum incubation

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

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 immune complex. After incubating for 30 minutes at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with wash buffer.

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 0.25 M H₂SO₄ to the wells. The shift in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

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.

Kit Contents

- STRIPS** Microtiter strips
12 single strips in a holder, each with 8 break-apart wells coated with the respective assay-specific antigen.
 - CONTROL+** Positive Control
1 x 1.5 mL stabilized human plasma, ready-to-use, can be integrated into the calibration curve, contains Proclin (< 0.1%), potentially infectious (see warnings)
 - CONTROL-** Negative Control
1 x 1.5 mL stabilized human plasma, ready-to-use, can be integrated into the calibration curve, contains Proclin (< 0.1%), potentially infectious (see warnings)
 - CAL 1-4** Calibrators 1-4
4 x 1.5 mL stabilized human plasma, ready-to-use, containing antibodies against the above mentioned antigens, contains Proclin (< 0.1%), potentially infectious (see warnings)
- | | 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 |
- * For batch specific concentration see QC document.
- DIL** Diluent
2 x 60 mL sample diluent, ready-to-use, contains Proclin (< 0.1%)
 - CONJ G** Enzyme conjugate
1 x 12 mL HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready-to-use
 - SUBS** TMB substrate
1 x 12 mL 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine, ready-to-use
 - STOP** Stopping solution
1 x 12 mL 0.25 M H₂SO₄ (sulfuric acid), ready-to-use
 - WASH** **CONC** Wash buffer 10 x concentrated
2 x 50 mL Wash buffer solution, to be diluted 1:10 with distilled or deionized water prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to dissolve any crystals.

Further Abbreviations

- RTU** ready to use

Materials Required but not Provided

1. 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micropipettes or a multichannel pipette (optional).
2. Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm).
3. Microtiter plate washer (if washing manually: wash bottle).
4. Reagent tubes for serum dilution.
5. Measuring cylinder.
6. Distilled or deionized water.

Warnings

1. Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
2. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Do not use contaminated reagents. Do not use reagents with damaged bottles or packaging. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
3. The control/calibrator materials of human origin provided have been tested for antibodies to HIV, HCV and for HBsAg and found to be negative. However, they should be treated as potentially infectious materials and capable of transmitting diseases. No guarantee is given that the samples are free of infections or microbial contamination.
4. The kit reagents may contain bovine components. To protect against infections with prions or zoonotic pathogens, standard occupational safety regulations (GLP) must be observed.
5. Do not use haemolysed, lipemic or icteric samples (Lit. 5, 6, 7).
6. Certain reagents are irritants, especially the Stopping solution and TMB substrate. 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.
7. Proclin is used as a preservative as marked. It may be toxic if ingested. Always dispose of by flushing to drain with plenty of water.

Precautions

1. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure without prior validation.
2. Do not use reagents beyond the expiry date.
3. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
4. Use disposable plasticware wherever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
5. Always use a new pipette tip for each pipetting step.

6. All reagents should be brought to room temperature (18 to 24 °C) before starting the test procedure.
7. Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly. Vigorous shaking leading to formation of foam should be avoided.
8. It is important to pipette with constant time intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same reaction conditions.
9. Only use laboratory water of the highest quality (e.g. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua iniectionabilia, HPLC grade).
10. In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or ELISA reader instrumentation.

Disposal

Kit reagents, samples and contaminated disposables should be disposed of in accordance with the relevant disposal guidelines and regulations for infectious materials.

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.

Sample Material

Both serum and plasma 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.

Thawed samples should be mixed (vortex) before used in the test!

Lipemic, hemolytic, icteric or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results (Lit. 5, 6, 7).

Test Procedure

1. Preparation of Reagents Samples

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

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

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. The user takes sole responsibility for any modifications to the test procedure.
- Reagents should not be left at room temperature for longer than necessary.
- A standard calibration curve should be established with each assay for quantitative results.
- Store any unused microtiter strips in the resealable aluminum bag provided and store under dry conditions at 2–8 °C.

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 verified 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 strips 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 strips for 30 minutes at room temperature.
6. Perform the washing step according to point 3.
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 carefully mixing read the optical density at 450 nm. 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.
After adding the stopping solution the developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

Interpretation of Results

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.

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

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.

Performance Characteristics

Clinical performance

To demonstrate clinical performance clinical samples (serum and plasma) were tested. Based on these the following clinical performance parameters were calculated.

	Formula
Diagnostic Sensitivity	$\frac{TP}{(TP + FN)}$
Diagnostic Specificity	$\frac{TN}{(TN + FP)}$
Positive predictive value (PPV)	$\frac{TP}{(TP + FP)}$
Negative predictive value (NPV)	$\frac{TN}{(TN + FN)}$
Efficiency	$\frac{(TP + TN)}{total}$
Positive likelihood ratio (PLR)	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$
Negative likelihood ratio (NLR)	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$

(Abbreviations: TP: True positive, TN: True negative, FN: False negative, FP: False positive)

	Sens	Spec	PPV	NPV	Eff.	PLR	NLR
SS-A	97.6%	99.0%	99.1%	98.1%	98.4%	>10	<0.1
SS-B	91.0%	99.3%	96.8%	97.9%	97.7%	>10	<0.1
Sm	92.9%	>99%	96.3%	99.1%	98.8%	>10	<0.1
Sm/RNP	96.3%	98.5%	98.1%	97.0%	97.5%	>10	<0.1
Scl-70	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	>10	<0.1
Jo-1	>99%	98.1%	85.7%	>99%	98.3%	>105	<0.1
CENP	92.1%	90.3%	92.1%	90.3%	91.3%	9.52	<0.1

(Abbreviations: PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, PLR: positive likelihood ratio, NLR: negative likelihood ratio, CENP: Centromer)

Precision

Repeatability was demonstrated on one batch with at least two different parameters over multiple measurement dates.

Reproduceability was demonstrated on multiple batches over multiple measurement dates.

Reporting serious incidents

All serious incidents that have occurred in connection with the device must be reported to the manufacturer and competent authority of the member state in which the user and / or patient is established.

References

You can find the references at the end of the instruction for use.

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)
5. Thomas, L.: Haemolysis as influence & interference factor (2002) eJIFCC 13(4) 95-8.
6. Nikolac, N.: Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management (2014) Biochem 24(1): 57-67
7. Mainali, S. et al: Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus (2021) Pract. Lab. Med. e00259

Änderungshistorie / Change History

Change history includes changes to significant aspects of the assay / IFU.

Chapter	Description of change
Warnings and Precautions	Separation into two different sections Inclusion of additional points for assay handling
Disposal	Separation from warnings and precautions
References	Addition of References for lipemic, haemolytic and icteric samples

**Mast Diagnostica GmbH,**

Feldstraße 20,
23858 Reinfeld,
Deutschland

Tel: +49 (0)4533 2007 0

Fax: +49 (0)4533 2007 68

email: mast@mast-diagnostica.de

Web: www.mast-group.com

Mast Group Ltd.

Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom

Tel: +44 (0)151 472 1444

Fax: +44 (0)151 944 1332

email: sales@mastgrp.com

Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic

12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France

Tél: +33 (3) 22 80 80 67

Fax: +33 (3) 22 80 99 22

email: info@mast-diagnostic.fr

Web: www.mast-group.com

Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1

Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1