

Scleroderma⁸ IgG

Bestellnummer: SCL8D-24

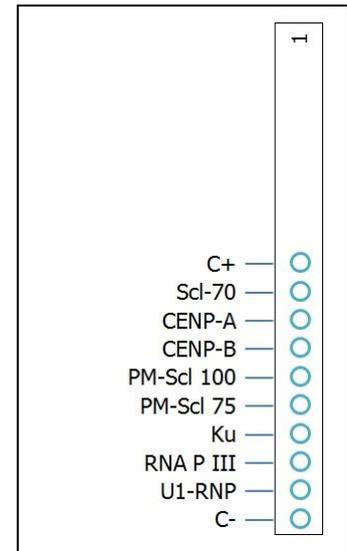
1 VERWENDUNGSZWECK

BlueDot Scleroderma⁸ IgG ist ein Immunodot-Kit für den Nachweis von IgG-Autoantikörpern in humanen Seren anhand der Antigene Scl-70, CENP-A, CENP-B, PM-Scl 100, PM-Scl 75, Ku, RNA Polymerase III und U1-RNP.

Mehr Informationen über die Art der Antigene sind über Ihren Verteiler oder auf unserer Website www.d-tek.be (MSDS) erhältlich.

2 PRINZIP DES TESTS

Der Test beruht auf dem Prinzip eines Enzym-Immunoassays. Der Teststreifen besteht aus einer Membran, die auf einem Kunststoffträger fixiert ist. Im Verlauf des Tests werden die Streifen mit den verdünnten Patientenseren inkubiert. Die humanen Antikörper, falls vorhanden, verbinden sich mit den entsprechenden spezifischen Antigenen auf der Membran. Ungebundene oder überschüssige Antikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden AP-konjugierte Antikörper von Ziegen gegen menschliches IgG auf die Streifen aufgebracht. Diese Enzyme binden an die Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einem zweiten Waschvorgang zum Entfernen überschüssigen Konjugats wird die Substratlösung hinzugegeben. Durch die Aktivität des Enzyms, sofern vorhanden, entwickeln sich purpurfarbene Punkte auf den Membranstreifen. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur Menge der Antikörper in der Probe.



3 KITINHALT

Abkürzungen:

AP = alkalische Phosphatase
BSA = Rinderserumalbumin
NBT = NitroBlue Tetrazol

BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat
MIT = MethylIsothiazolon
TBS = Kochsalzlösung mit Tris-Puffer

<u>ZU VERDÜNNEN</u> :	(10 x) Waschpufferlösung	1 x 40 ml (farblos) Enthält: TBS, Tween ; Konservierungsmittel : MIT
<u>GEBRAUCHSFERTIG</u> :	Teststreifen	24 Stück Je 10 Punkte: 1 Negativkontrolle (C-) 8 Antigene 1 Positivkontrolle (C+)
	Verdünnungspuffer	1 x 40 ml (gelb) Enthält : TBS, BSA, Tween ; Konservierungsmittel : MIT
	Konjugat	1 x 40 ml (rot) Enthält : AP-konjugiertes Antihuman-IgG aus der Ziege, Konservierungsmittel: MIT
	Substrat	1 x 40 ml (braune Flasche, hellgelbe Lösung) Enthält: NBT/BCIP; Konservierungsmittel: 0.05 % NaN ₃ (Natriumazid)
	Inkubationsschalen	3 Stück mit 8 Inkubationsrinnen

4 ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Wippschüttler / Mikropipetten / Timer / Meßzylinder / destilliertes oder entmineralisiertes Wasser / Pinzetten / Zellstoff bzw. Filterpapier

5 LAGERUNG

Die angemischte Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens einen Monat haltbar. Reagenzien und Streifen können bei 2-8 °C bis zum Ablaufdatum, das auf jeder Flasche bzw. jedem Röhrchen angegeben ist, aufbewahrt werden.

Legen Sie ungebrauchte Streifen zurück in das mitgelieferte Röhrchen, verschließen Sie es und bewahren Sie es bei 2-8 °C auf. Das Chromogen/Substrat (NBT/BCIP) sollte bei 2-8 °C gelagert werden.

6 VORSICHTSMAßNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur für "in vitro" diagnostische Zwecke bestimmt und dürfen nur von Fachpersonal verwendet werden. Der Kit enthält potenziell schädliche Komponenten. Vermeiden Sie

daher Kontakt mit Haut, Augen oder Schleimhäuten. Patientenproben sollten immer als potenziell infektiös behandelt werden. Verwenden Sie keine anderen Reagenzien und benutzen Sie keine Streifen mit unterschiedlichen Chargennummern, um Abweichungen der Resultate zu vermeiden. Berühren Sie die Streifen nicht mit den Fingern. Verwenden Sie Pinzetten oder tragen Sie Laborhandschuhe. Lassen Sie die Reagenzien und Streifen Zimmertemperatur erreichen. Halten Sie die Inkubationszeiten genau ein. Handhaben Sie das Chromogensubstrat (NBT/BCIP) mit großer Sorgfalt, um jede Verunreinigung mit alkalischer Phosphatase zu vermeiden.

7 ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Proben sollten vorzugsweise frisch abgefüllt werden. Seren mit Verunreinigungen sollten mit niedriger Drehzahl zentrifugiert werden. Blutproben sollten in trockenen Röhrchen oder in Röhrchen mit EDTA oder Heparin abgefüllt werden. Nach der Abtrennung sollten die Serumproben unverzüglich verwendet werden. Andernfalls sind sie sofort aufzuteilen und können dann einige Tage bei 2-8 °C bzw. eingefroren bei -20 °C auch über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

8 TESTVERFAHREN

GRUNDSÄTZLICHE HANDHABUNG UND TIPPS ZUR HANDHABUNG:

Die Antigen- und Kontrollpunkte sind auf den Streifen blau vorgefärbt, um sicherzustellen, daß alle Antigene richtig auf die Membran aufgebracht sind. Diese **blaue Färbung verschwindet** im ersten Inkubationsschritt. Während der Inkubation mit dem Waschpuffer erscheint auf der Membran eine schwache rosa Hintergrundfärbung, die beim Trocknen am Ende der Abarbeitung wieder verschwindet. Während der Inkubation muss die Schale **immer geschüttelt** werden um eine gründliche Zirkulation der Flüssigkeiten über der Membran zu gewährleisten. Ein **Wippschüttler** ist dafür das geeignete Gerät. Stellen Sie die Amplitude des Schüttlers so ein, daß keine Lösung aus den Rinnen überschwappt oder in benachbarte Rinnen gelangen kann.

Nach jeder Befüllung der Inkubationsrinnen kippen Sie die Inkubationsschale kurz von Hand bis die Streifen vollständig benetzt sind um evtl. anhaftende Luftbläschen unter den Streifen zu entfernen. Alternativ können Sie aufschwimmende Streifen durch Drücken (mit einer Pinzette oder Pipettenspitze) auf die Oberseite der Streifen, jedoch nicht an der Position der Antigene in die Lösung, untertauchen.

Vermeiden Sie jede Berührung der Membran des Streifens mit den Fingern, Pinzetten oder Pipetten. Fassen Sie die Streifen stets nur an der oberen beschrifteten Kunststoffzone an. Alle Arbeitsschritte sollen **bei Zimmertemperatur (20⁰-24⁰C)** stattfinden.

8.1 Vorbereitung der Reagenzien

1. Lassen Sie alle Komponenten Zimmertemperatur erreichen .
2. **Verdünnen** Sie die konzentrierte **Spülpufferlösung 10 x** mit **destilliertem Wasser**.
Setzen Sie 15 ml verdünnte Spülpufferlösung pro Teststreifen.
Beispiel: 1,5 ml konzentrierte Spülpufferlösung + 13,5 ml destilliertes Wasser für einen Streifen.

8.2 Abarbeitung des Tests

Hinweis: ALLE Inkubationsschritte müssen auf einem Wippschüttler stattfinden

1. **Setzen** Sie einen Streifen pro Patient in die Rinnen, mit den blauen Punkten **nach oben**
2. Je **2 ml Waschpufferlösung** pro Rinne pipettieren. **10 min Inkubieren (Schütteln)**
Nach ausreichender Inkubation verschwindet die blaue Färbung der Punkte völlig.
Falls nicht, warten Sie, bis die Färbung der Punkte vollständig verschwunden ist.
3. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
4. Je **1,5 ml Probenverdünnungspuffer** pro Rinne pipettieren.
5. **Je 10 µl der unverdünnten Patientenprobe pipettieren. 30 min Inkubieren. (Schütteln)**
Berühren Sie die Membran nicht mit der Pipettenspitze. Lassen Sie die Probe am besten über den oberen Teil der Streifen (Kunststoffzone) in die Lösung laufen.
Hinweis: Die Schritte 4 und 5 können durch Vorverdünnen der Probe in einem Glas- oder Kunststoffröhrchen *zusammengefaßt* werden (1,5 ml Lösungsmittel + 10 µl Patientenprobe → Mischen → in den Schacht geben).
6. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
7. **3 x 3 Minuten** mit **je 1,5 ml Waschpufferlösung pro Rinne** inkubieren (**Schütteln**)
Nach jedem Waschvorgang den Puffer durch langsames Umdrehen aus den Rinnen laufen lassen. Die

- Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale mit Zellstoff.*
8. Je **1,5 ml Konjugat** pro Rinne pipettieren. **30 min inkubieren (Schütteln)**
 9. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
 10. **3 x 3 Minuten** mit **je 1,5 ml Waschpufferlösung** pro Rinne inkubieren (siehe Schritt 6).
Nach jedem Waschvorgang den Puffer durch langsames Umdrehen aus den Rinnen laufen lassen. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale mit Zellstoff.
 11. Je **1,5 ml Substrat** pro Rinne pipettieren. **10 min inkubieren (Schütteln).**
 12. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
 13. **1 x 3 Minuten** mit **1,5 ml Waschpufferlösung** pro Rinne inkubieren (**Schütteln**), um die Reaktion zu unterbrechen.
 14. **Entnehmen** Sie die Streifen aus den Rinnen und trocknen Sie diese durch kurzes Andrücken auf Zellstoff oder Filterpapier. Dann noch 30 Minuten trocknen lassen. Das Auswerten muss innerhalb 24 Stunden nach Testverarbeitung erfolgen.

9 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

9.1 Auswertung

1. Lösen Sie die **Abdeckfolie** von der **selbstklebenden Rückseite** jedes Streifens und kleben Sie die Streifen mit den Punkten nach oben auf die entsprechend gekennzeichneten Felder des mitgelieferten Auswertungsbogens. Dieser zeigt die zugehörigen Positionen der unterschiedlichen Kontroll- und Antigenpunkte auf der Membran an.
2. Der erste obere Dot (Positivkontrolle) muss bei allen Patienten positiv sein.
Nur ein eindeutig gefärbter Positivkontrolldot gewährleistet, dass Ihre Resultate gültig sind und der Test richtig abgelaufen ist bzw. die Einzelkomponenten des Kits nicht beeinträchtigt waren. Ist der erste obere Dot nicht gefärbt, ist der Test ungültig und kann nicht ausgewertet werden.
3. Die spezifischen Antigendots mit dem negativen Kontrolldot (immer der letzte Dot) vergleichen. Die Farbintensität der Antigendots ist direkt proportional zum Titer des spezifischen Antikörpers in der Patientenprobe.
Die Farbintensität der Negativkontrolle ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Unter optimalen Bedingungen und sofern die Probe frei von störenden Matrixeffekten ist, kann der negative Kontrolldot u.U. fast farblos sein. Im Gegensatz dazu weisen stark gefärbte negative Kontrolldots auf einen hohen Anteil unspezifischer Bindung in der Probe hin.

POSITIVES ERGEBNIS:

Eine Probe ist für einen spezifischen Antikörper positiv, wenn die Farbintensität des zugehörigen Antigendots sichtbar stärker ist als die Intensität des negativen Kontrolldots.

NEGATIVES ERGEBNIS:

Eine Probe ist für einen spezifischen Antikörper negativ, wenn die Farbintensität des entsprechenden Antigendots schwächer oder gleich stark wie die Intensität des negativen Kontrolldots ist.

NB: Die schwache Färbung eines Antigendots, wenn sie der Intensität des negativen Kontrolldots mehr oder weniger entspricht, kann fürs Auge schwer deutbar sein. In solchen Fällen ist die Benutzung des Dr DOT Software und Scanning Systems (mehr Informationen über die Dr DOT Software sind über Ihren Verteiler erhältlich) für akkuratere Interpretation von Vorteil.

Dr DOT arbiträre Einheiten (AU)	Interpretation
< 5	Negativ
5 – 10	equivokal (*)
>10	Positiv

* Niedrige Autoantikörper-Titer können bei gesunden Patienten auftreten. Aus diesem Grund sollten niedrig-positive Ergebnisse (zwischen 5 und 10 AU), obgleich gültig, als equivokal (zweideutig) betrachtet werden. Erneutes Testen des Patienten, vorzugsweise unter Verwendung einer neuen Probe, wird daher empfohlen. Sollte das Ergebnis nach erneutem Testen immer noch zweideutig sein, müssen andere diagnostische Tests und / oder klinische Informationen vorgenommen werden, um den autoimmunen Zustand des Patienten zu bestimmen.

10. TESTCHARAKTERISTIK

10.1 Reproduzierbarkeit

Referenzkontrollproben wurden für jeden Antikörper in statistisch relevanten Wiederholungen innerhalb eines Laufs oder über mehrere Läufe für die Berechnung der Intra-und Inter-Assay-Variation getestet. Die Intensität der Dots war immer innerhalb des spezifizierten Bereichs, und die Standardabweichung betrug weniger als 10%. *Detaillierte analytische Daten sind auf Anfrage erhältlich.*

10.2 Sensitivität und Spezifität

Charakteristische Proben (durch Referenzlaboratorien und/oder –methoden bestätigte positive oder negative Proben der jeweiligen Antikörper) wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Sensitivität und Spezifität wurden anhand der DrDOT Resultate berechnet.

Scl-70	CENP-A	CENP-B	PM-Scl 100																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 13</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 0</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 91</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100% Spezifität 100%</p>		+	-	+	richtig positiv 13	falsch positiv 0	-	falsch negativ 0	richtig negativ 91	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv /</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv /</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ /</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität - % Spezifität - %</p>		+	-	+	richtig positiv /	falsch positiv /	-	falsch negativ /	richtig negativ /	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 16</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 1</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 97</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100 % Spezifität 99 %</p>		+	-	+	richtig positiv 16	falsch positiv 1	-	falsch negativ 0	richtig negativ 97	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 10</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 0</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 24</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100% Spezifität 100%</p>		+	-	+	richtig positiv 10	falsch positiv 0	-	falsch negativ 0	richtig negativ 24
	+	-																																					
+	richtig positiv 13	falsch positiv 0																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 91																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv /	falsch positiv /																																					
-	falsch negativ /	richtig negativ /																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv 16	falsch positiv 1																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 97																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv 10	falsch positiv 0																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 24																																					
PM-Scl 75	Ku	RNA-Polymerase III	U1-RNP																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv /</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv /</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ /</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ /</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität - % Spezifität - % <small>momentan keine Referenzmethode verfügbar!</small></p>		+	-	+	richtig positiv /	falsch positiv /	-	falsch negativ /	richtig negativ /	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 22</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 0</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 50</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100% Spezifität 100%</p>		+	-	+	richtig positiv 22	falsch positiv 0	-	falsch negativ 0	richtig negativ 50	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 4</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 0</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 264</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100 % Spezifität 100 %</p>		+	-	+	richtig positiv 4	falsch positiv 0	-	falsch negativ 0	richtig negativ 264	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: center;">+</th> <td style="text-align: center;">richtig positiv 43</td> <td style="text-align: center;">falsch positiv 2</td> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">-</th> <td style="text-align: center;">falsch negativ 0</td> <td style="text-align: center;">richtig negativ 93</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sensitivität 100% Spezifität 98%</p>		+	-	+	richtig positiv 43	falsch positiv 2	-	falsch negativ 0	richtig negativ 93
	+	-																																					
+	richtig positiv /	falsch positiv /																																					
-	falsch negativ /	richtig negativ /																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv 22	falsch positiv 0																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 50																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv 4	falsch positiv 0																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 264																																					
	+	-																																					
+	richtig positiv 43	falsch positiv 2																																					
-	falsch negativ 0	richtig negativ 93																																					

Für Antigen(e) *in grau*: da zurzeit entweder keine deutlich charakteristische Probe oder aber keine Referenzmethode für diesen Parameter verfügbar ist, können unmöglich Werte für diese Antigene vermittelt werden.

11. TESTBESCHRÄNKUNGEN

1. Eine Diagnose sollte keinesfalls ausschließlich auf Grundlage der Ergebnisse dieses Tests erfolgen.
2. Testergebnisse sollten immer in Verbindung mit einer vollständigen klinischen Bewertung und den Resultaten anderer diagnostischer Verfahren beurteilt werden.
3. D-tek und seine Verteiler sind nicht haftbar, weder direkt, indirekt noch konsequent, für Schäden die aufgrund unerlaubter Änderungen im Arbeitsverlauf entstanden sind. Der Kit soll nur von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden.
4. Die Grundsätze der GLP («Gute Labor Praxis») sollten durchgehend angewendet werden.
5. D-teks Verbindlichkeit ist in jedem Fall auf den kostenlosen Ersatz des Kits begrenzt.

12. PANNENHILFE

Färbung erscheint nicht	<ul style="list-style-type: none"> - Benutzung von konzentrierter statt verdünnter Waschpufferlösung - Zu sehr verdünnte Proben - Benutzung verdünnten Konjugats (= gebrauchsfertig !) - Nicht-aktiviertes Konjugat
Hintergrundfärbung	<ul style="list-style-type: none"> - Schlechte Serumqualität: Partikeln, altes Serum, bakterielle Kontamination - Schritt 8.2.2 der Arbeitsanleitung war unzureichend oder ist vergessen worden - Unzureichender Waschvorgang - Inkubationszeit zu lang - Inkubationstemperatur zu hoch - Proben nicht genug verdünnt - Kontaminiertes NBT

Sollte dieser Kit aus irgendwelchem Grund außerhalb der Verantwortung der Testperson nicht korrekt funktionieren, wenden Sie sich bitte an Ihren Verteiler

13. BIBLIOGRAPHIE

Aktuelle Literatur erhalten Sie auf Anfrage. Bitte wenden Sie sich an info@d-tek.be