

recomLine Scleroderma IgG

Immunoassay mit rekombinanten Antigenen zum Nachweis von IgG-Auto-Antikörpern gegen charakteristische Antigene bei der Autoimmunerkrankung Sklerodermie.

1. Allgemeines, Verwendungszweck

Der *recomLine Scleroderma* ist ein qualitativer in vitro Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG-Autoantikörpern gegen Sklerodermie-assoziierte Antigene. Da der *recomLine Scleroderma* weitere Sklerodermie-Antigene aufweist, kann er ergänzend zum *recomLine ANA/ENA* verwendet werden. Der *recomLine Scleroderma* dient als Bestätigungstest nach positiven Ergebnis im Indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIF). Bei entsprechendem klinischen Hinweis wird eine Durchführung ohne vorheriges IIF-Screening empfohlen.

2. Systemische Sklerodermie

Im Fall der systemischen Sklerose (= Sklerodermie, Progressive systemische Sklerodermie PSS) greift das Immunsystem körpereigenes Bindegewebe an, löst dadurch Entzündungsreaktionen aus und führt in der Folge zu Elastizitätsverlust und Verhärtung der betroffenen Strukturen. In der Regel sind die Haut und die peripheren Blutgefäße betroffen. Die Zielorgane betreffend, ist die Sklerodermie durch eine außergewöhnlich variantenreiche Symptomatik gekennzeichnet. Das heißt, es können die unterschiedlichsten Organe, wie Magen-Darm-Trakt, Herz, Leber, Lunge, Niere und Augen betroffen sein (Multiorganerkrankung). Typische klinische Erscheinungen sind Dermatofibrose und Durchblutungsstörungen insbesondere der Finger und Zehen (Raynaud-Syndrom). Verschiedene Varianten der systemischen Sklerose unterscheiden sich nach Ausdehnung des Hautbefalls und Art der betroffenen Organe. Die Prognose der Erkrankung hängt von der Variante ab. Diese kann serologisch durch den *recomLine Scleroderma* bestimmt werden.

3. Diagnostik

Die Diagnose erfolgt anhand der klinischen Symptome, histologisch sowie durch serologischen Autoantikörpernachweis. Als serologischer Screening-Test wird überwiegend die Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Der *recomLine Scleroderma* dient zur Bestätigung eines nukleolären oder centromeren IIF-Musters. Der Test enthält die rekombinanten humanen nukleolären Antigene DNA-Topoisomerase Scl70, eine RNA-Exoribonuklease PMScl100 (=PM-1, Scl-B oder PL-6) und das Fibrillarin Scl34 (=U3-RNP). Zum Nachweis der anti-Centromer-Antikörper (ACA) wird im *recomLine Scleroderma* das am häufigsten vorkommende CENPB verwendet. Antikörper gegen Scl70 werden vor allem bei diffuser systemischer Sklerodermie und Anti-Centromer-Antikörper bei limitierter systemischer Sklerose (CREST-Syndrom) nachgewiesen. Antikörper gegen PMScl finden sich v.a. bei einem Polymyositis/Sklerodermie-Overlap-Syndrom und Antikörper gegen Scl34 deuten auf eine Sklerodermie mit Dünndarmbeteiligung.

4. Testprinzip

Die rekombinanten, hochgereinigten Proteine werden auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Diese Matrix wird anschließend in Streifen geschnitten.

Zum Nachweis von Sklerodermie-spezifischen Autoantikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serum- oder Plasmaprobe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen und die Streifen in einem zweiten Schritt mit anti-human-IgG inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheint an der entsprechenden Stelle eine dunkle Bande auf dem Streifen.

Am oberen Ende der Teststreifen befinden sich untereinander drei Kontrollbanden:

1. Die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.
2. Die Konjugatkontrolle IgG: diese Bande dient zur Kontrolle der jeweiligen nachgewiesenen Antikörperklasse. Das Auftreten der Bande zeigt an, dass Konjugat zugegeben wurde.

3. "Cutoff-Kontrolle": zur Kontrolle des Färbeprozesses bzw. Auswertung der Teststreifen. Die Intensität dieser Bande erlaubt die Beurteilung der Antikörper-Reaktivität in positiv, fraglich oder negativ.

5. Packungsinhalt

recomLine Scleroderma IgG

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Waschpuffer A (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxyprion (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g	Magermilchpulver
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 10 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Sklerodermie Antigenen
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG Konjugat (hundertfach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1%)

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser (hohe Qualität), Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

Inkubationsschalen (sind bei Bedarf von der MIKROGEN GmbH zu beziehen),

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid, MIT (Methylisothiazolon) und Chlorazetamid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Kommen in verschiedenen recomLine-, recomBlot- und ImmunoBlot-Testen die gleichen Reagenzien zum Einsatz (siehe Symbol-Aufdruck), können diese parameter- und chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.

Vor Gebrauch die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenserien ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Streifen sind mit der fortlaufenden Nummer, sowie dem Testkürzel gekennzeichnet.

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Die Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3 Herstellung der Lösungen

7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers A

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschritte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers A für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer A-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer A ist geruchlos und leicht getrübt.

Tabelle 1: Waschpuffer A pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer A-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Herstellung der Konjugatlösung

Die Konjugatlösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG-Konjugat-Konzentrats wird mit 100 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer A verdünnt (1 + 100).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Tabelle 2: Volumina der Anti-human-IgG-Konjugat-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen *	IgG-Konjugat-Konzentrat	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) bringen.

Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

7.4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2 °C - 8 °C lagern.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2 °C - 8 °C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von lipämischen, hämolytischen oder trüben Proben kann einen dunklen Hintergrund auf den Streifen *recomLine Scleroderma IgG* ergeben. Diese Proben können darüber hinaus zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt (siehe 6). In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A pipettiert. In die mit gebrauchsfertigem Waschpuffer A gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Die Streifen müssen vollständig mit gebrauchsfertigem Waschpuffer A benetzt und untergetaucht sein.

Verwendete Röhrchennummer und Streifennummer im Auswertebogen notieren.

2. Probenzugabe

IgG-Testdurchführung: 20 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) werden je Inkubationsansatz zum Teststreifen pipettiert. (Verdünnung 1 + 100)

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer A einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden.

9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer A abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 9.3).

9.6 Substratreaktion

1. In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und **5 - 10 Minuten** unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Sobald die Cutoff-Kontrollbande zu sehen ist, wird der Färbeprozess beendet.

9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein.
3.	jeweils 20 µl von der Probe einpipettieren
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren.
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen

11. Auswertung

11.1 Bewertung der Bandenintensität

1. Notieren Sie im beigelegten Auswertebogen Datum und Chargen-Nummer.
2. Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
3. Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktionskontroll-Bande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
4. Identifizieren Sie nun die Banden der entwickelten Teststreifen anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens und tragen diese in das Protokollblatt ein. Nehmen Sie dazu anhand der Tabelle 3 die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden gesondert für die entsprechenden Immunglobulin-Klassen vor.

11.2 Kontrollergebnisse

Eine Auswertung des Tests kann erfolgen, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Reaktionskontroll-Bande (oberste Linie) deutlich gefärbt, dunkle Bande
- Antikörperklasse (zweite Bande): die Konjugatkontrollbande muss eine deutliche Färbung zeigen.
- Cutoff-Kontrolle (dritte Bande): schwache, aber sichtbare Färbung

Tabelle 3: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Banden	Intensität
keine Reaktion	-
sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	±
schwache Intensität (entspricht Cutoff-Bande)	+
starke Intensität (stärker als Cutoff-Bande)	++
sehr starke Intensität	+++

11.3 Testergebnisse

Zeigt mindestens eine der Antigenbanden eine gleich starke oder stärkere Intensität wie die Cutoff-Bande (d.h. mind. „+“), liegt meist eine systemische Sklerodermie vor.

Ein negatives Serum liegt vor, falls alle Banden mit „-“ bewertet werden. ± Intensitäten sind generell als negativ zu bewerten, sollten aber mehrere Banden ± aufweisen, sollte das Serum einer weiteren Überprüfung unterzogen werden.

Zur Auswertung des Testergebnisses müssen die positiven Antigenbanden deutlich erkennbar sein, das heißt z.B. die Hintergrundreaktion darf nicht zu stark ausfallen. Sonst ist der Test zu wiederholen.

Teststreifenauswerte-Software: recomScan

Die recomScan-Software ist zur Unterstützung der Interpretation der recomLine Scleroderma-Teststreifen bestimmt.

Weitere Informationen hierzu erhalten Sie auf Anfrage bei MIKROGEN.

Achtung:

Verwenden Sie nicht die automatisierte Interpretation ohne die unten beschriebenen Hinweise zur Interpretation zu beachten.

11.4 Testinterpretation

- Scl70 positiv: spricht meist für diffuse Formen der Sklerodermie mit einem oft schweren, systemischen Verlauf bedingt durch das Auftreten von internen Manifestationen (Herz-, Lungen- und Nierenbeteiligung).
- CENPB positiv: v.a. beim CREST-Syndrom oder ähnliche Varianten mit meist milderen Verlaufsformen. CENPB-Autoantikörper können auch bei der Primär-biliären Zirrhose auftreten.
- PMScl positiv: diese nur isoliert auftretenden Autoantikörper sind v.a. bei Patienten mit einem Polymyositis/Sklerodermie-Overlap-Syndrome nachweisbar. Sie kommen aber auch bei idiopathischer Myositis und Sklerodermie vor. Diese Autoantikörper deuten auf einen milden Verlauf hin ohne kardiale bzw. Nierenmanifestationen.
- Scl34 positiv: diagnostischer Marker für Sklerodermie und ein prognostischer Marker für eine Verlaufsform mit Dünndarm- und Skelettmuskelbeteiligung und pulmonaler Hypertonie.

11.5 Hinweise zur Interpretation

Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer systemischen Sklerodermie nicht aus.

Alle Testergebnisse sollten als Ergänzung zum klinischen Bild betrachtet werden. Zur Festlegung der Diagnose einer Sklerodermie sind neben den Laborwerten in jedem Fall auch die klinischen Befunde und die zugehörige Anamnese mit einzubeziehen.

Dunkle Teststreifen: Manche Patientenserum können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

12. Klinische Ergebnisse

Tabelle 4: Sensitivität

	Anzahl getestet	positiv	Sensitivität (%)
ScI70	16	13	81
PMScl	9	6	67
ScI34	1	1	100
CENPB	45	40	89

Die Antigene ScI70 und CENPB befinden sich auch auf dem *recomLine* ANA/ENA IgG von MIKROGEN: Dieser Test wurde bereits Ende 2002 erfolgreich auf dem europäischen Markt eingeführt. Die Reaktivität der beiden Antigene wurde in mehreren Studien bzw. Ringversuchen bestätigt.

Tabelle 5: Sensitivität mit klinisch definierten Seren

	gesamt	positiv	Sensitivität (%)
ScI70	21	18	86
CENPB	22	22	100
Gesamt	43	40	93

Von den insgesamt 43 klinisch definierten Sklerodermiepatienten wurden mit dem *recomLine* Scleroderma 40 Seren erkannt. Das entspricht einer Sensitivität von 93%. Drei Seren wurden durch den *recomLine* Scleroderma nicht erkannt. Zwei davon zeigten auch in verschiedenen ELISA-Testen kein positives Ergebnis. Eines war ScI70 positiv.

Tabelle 6: Spezifität: ermittelt anhand von negativen Seren und Problemseren

	<i>recomLine</i> Scleroderma IgG		
	gesamt	negativ	positiv
Blutspender	100	95	5
Potentiell kreuzreagierende EBV-Infektionen, Schwangere, Rheumafaktor Positive	40	39	1
Problemseren in der Laborroutine Ikterische, Hämolytische u. Lipämische Seren	30	27	3
Andere Autoimmunerkrankungen Sjögren Syndrom, Systemischer Lupus, u.a.	123	118	5
Spezifität	95%		

Des weiteren wurden 2 Seren, die von der Arthritis Foundation und CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt und durch IIF bzw. Ouchterlony Immundiffusion spezifiziert wurden, getestet:

CDC#9 (Anti-ScI70) reagiert im *recomLine* Scleroderma mit 2+

CDC#11 (Anti-PMScl) reagiert im *recomLine* Scleroderma mit +

Diese Seren gelten als Referenzseren und wurden in weiteren Laboratorien bestätigt.

Informationen zu den Seren sind bei MIKROGEN erhältlich und eine ausführliche Beschreibung liefert Smolen et al.

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 17.

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur zum Thema Sklerodermie bzw. Kollagenosen zu.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 19.

recomLine Scleroderma IgG

Immuno assay with recombinant antigens for detection and identification of IgG autoantibodies to characteristic antigens in the autoimmune disease scleroderma.

1. General aspects, intended use

The *recomLine Scleroderma* is a qualitative in vitro test for detection and identification of IgG autoantibodies to scleroderma-associated antigens. Since the *recomLine Scleroderma* contains additional scleroderma antigens it can be used to supplement the *recomLine ANA/ENA*. The line assay serves as a confirmation test after positive results in the indirect immunofluorescence test (IIF). Also recommended for use without previous IIF screening if this is clinically indicated.

2. Systemic Scleroderma

In cases of systemic sclerosis (= scleroderma, progressive systemic scleroderma, PSS), the immune system attacks the own connective tissue, thereby eliciting an inflammatory reaction and consequently resulting in a loss of elasticity and development of sclerosis in the affected structures. The tissues normally affected are the skin and peripheral blood vessels. As far as the target organs are concerned, scleroderma is characterised by an unusually wide variety of symptoms. This also means a wide variety of organs may be affected, e.g. the gastrointestinal tract, heart, liver, lungs, kidneys and eyes (multiorgan disease). Typical clinical signs include dermatofibrosis and circulatory problems in the fingers and toes particularly (Raynaud's syndrome). The different variants of systemic sclerosis differ in the extent of dermal involvement and the type of organs affected. The prognosis of the disease depends on the particular variant manifested. This can be determined serologically using *recomLine Scleroderma*.

3. Diagnosis

Diagnostic procedure is based on the clinical symptoms, histology and serological antibody detection and identification. Indirect immunofluorescent microscopy is the screening test method normally used. *recomLine Scleroderma* is used for confirmation of a nucleolar or centromeric IIF pattern. The test contains the recombinant human nucleolar antigen DNA topoisomerase Scl70, an RNA exoribonuclease PMScl100 (=PM-1, Scl-B or PL-6) and fibrillarin Scl34 (=U3-RNP). CENPB, the centromere antigen occurring most frequently in *recomLine Scleroderma*, is used for detection of the anti-centromeric antibody (ACA). Antibodies to Scl70 are detected mainly in cases of diffuse systemic scleroderma and anti-centromeric antibodies are observed mainly in case of limited systemic sclerosis (CREST syndrome). Antibodies to PMScl most often indicate a polymyositis-scleroderma overlap syndrome and antibodies to Scl34 are indicative of a scleroderma with small intestine involvement.

4. Test principle

The recombinant, highly purified proteins are applied to a nitrocellulose membrane. This matrix is then cut into strips.

For the detection of Scleroderma-specific autoantibodies, the strips are incubated with the diluted serum or plasma sample, whereby the antibodies bind to the antigens on the strips. Unbound antibodies are then flushed away and the strips are incubated in a second step with anti-human IgG coupled with horse radish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by means of a colour reaction catalysed by the peroxidase. If an antigen-antibody reaction has taken place, a dark band appears at the corresponding locus on the strip.

Three control bands are arranged side-by-side at the upper end of the test strip:

1. the reaction control band under the strip number, which must show a reaction to every serum.
2. conjugate control band IgG: This band serves as a control for the antibody class detected in each case.
3. "cutoff control": For control of the coloration process and evaluation of the test strip. The intensity of this band provides a basis for evaluation of the antibody reactivity as positive, borderline or negative.

5. Package contents

recomLine Scleroderma IgG

The reagents in a pack are sufficient for 20 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Wash buffer A (ten times the concentration) contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent and preservatives MIT (0,1%) and Oxypyrion (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Substrate Solution Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
MILKPOW	5 g	Skim milk powder
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TESTSTR	2 pieces	Test tubes with 10 consecutively numbered test strips, coated with recombinant Scleroderma-antigens
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG conjugate (green screw cap, hundred times the concentration) from rabbit, contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamide (<0,1%)

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water (high quality), vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

Incubation trays (can be obtained from MIKROGEN GmbH)

7. Information on test and reagents

7.1 Precautions

- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide, MIT (methylisothiazolone) and Chloracetamide. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least 1 hour.
- ☞ Use incubation trays only once.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2 °C - 8 °C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18 °C - 25 °C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Identical reagents (according to the printed symbols) in all *recomLine*-, *recomBlot* and *ImmunoBlot*-tests can be used irrespective of parameter or lot. Please mind the expire date of the components.

Mix the concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The remaining strips must be left in the tube and stored further at 2 °C - 8 °C (reclose tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

The strips are consecutively numbered and marked with the shortcut of the respective test.

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Please protect all kit components from direct sun light.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3 Preparation of solutions

7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer A

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer A required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer A concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks. Ready-to-use wash buffer A is slightly turbid and scentless.

Table 1: Wash buffer A per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer A concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Preparation of conjugate solutions

The conjugate solution is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG conjugate concentrate is diluted with 100 parts of ready-to-use wash buffer A (1 + 100).

See Table 2 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Table 2: Volumes for anti-human IgG conjugate dilution

Test strips used *	IgG conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips, etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

7.4 Storage and stability

Store reagents at 2°C - 8°C before and after use.

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or turbid samples may result in a dark background in the *recomLine Scleroderma IgG*. These samples may also result in false results and should therefore not be used.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C-8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or colder. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 9.3. and 9.5 should therefore always be maintained.

9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray (see 6) is required per sample to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer A is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with ready-to-use wash buffer A using a plastic forceps. The strip number must face upwards.

Important!

The strip must be completely wet and immersed in the ready-to-use wash buffer A.

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

IgG test procedure: **20 µl** of an undiluted sample (human serum or plasma) is pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer A and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

Important!

Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid.

9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

Important!

When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.

In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer A in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer A is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2) into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 9.3).

9.6 Substrate reaction

1. Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate for **5 - 10 minutes**, shaking gently and under observation, at room temperature.
2. You should terminate the reaction as soon as the cutoff control band can be seen.

9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

10. Summary of the test procedure

1.	bring all reagents to room temperature
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer A and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer A
3.	pipette 20 µl of the sample
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for 5 - 10 minutes
10.	wash the strips at least three times with deionised water
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result

11. Evaluation

11.1 Evaluation of band intensity

1. On the enclosed evaluation sheet, record the date, lot and tube number.
2. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
3. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
4. Now identify the bands of the developed test strips based on the printed control strip on the evaluation sheet and record them in the protocol sheet (Table 3). Identify the bands on the test strips separately for the respective immunoglobulin classes.

11.2 Control results

The test can be evaluated if the following criteria are met:

- Reaction control band (upper line) pronounced colour, dark band
- Antibody class (second band): The conjugate control band must show a clear colour reaction.
- Cutoff control (third band): weak, but clearly evident colouring.

Table 3: Intensity of bands in relation to the cutoff band

Bands	Intensity
No reaction	-
Intensity weaker than the cutoff band	±
Same intensity as the cutoff band	+
Strong intensity (stronger than the cutoff band)	++
Very strong intensity	+++

11.3 Test results

If one band shows equal or stronger reactivity than the cutoff ("+" or stronger), the test result is positive and supports the diagnosis of scleroderma.

The result is negative, if all bands are evaluated with "-". If one band shows "+/-" intensity the result is also negative, if several bands show "+/-", the serum requires further verification..

Clear antigen bands and low background interferences are essential for analysis. It is otherwise recommended to repeat the test.

Test strip interpretation software: *recomScan*

The *recomScan* software is designed for support of the interpretation for **recomLine Scleroderma** test strips.

Further information you will receive on request from MIKROGEN.

Warning:

Please do not use the automated interpretation without taking into account „Directions for Interpretation“ mentioned below.

11.4 Test interpretation

- Scl70 positive: Usually a sign of diffuse forms of scleroderma, often with a severe systemic course due to occurrence of internal manifestations (cardiac, pulmonary and renal involvement).
- CENPB positive: Observed mainly in the presence of CREST syndrome or similar variants, usually with milder courses. CENPB autoantibodies may also occur in primary biliary cirrhoses.
- PMScl positive: These autoantibodies occur in isolated cases only, mainly in patients with a polymyositis-scleroderma overlap syndrome. However, they may also occur in cases of idiopathic myositis and scleroderma. These autoantibodies presage a mild course with neither cardiac nor renal manifestations.
- Scl34 positive: Diagnostic marker for scleroderma and a prognostic marker for a disease course involving the small intestine and skeletal musculature and characterised by pulmonary hypertension.

11.5 Notes on interpretation of the results

A negative result does not exclude the possibility of a systemic scleroderma.

All test results should be considered as supplements to the clinical picture. The clinical findings and medical history must in any case be considered in confirming a diagnosis of scleroderma in addition to the laboratory values.

Dark test strips: Some patient sera may cause a dark, continuous or patterned coloration on the entire nitrocellulose strip (e.g. sera from patients with milk protein allergies). Various different factors in each patient serum are responsible for this effect. Evaluation of these strips is usually feasible in a restricted sense only. For instance, "inverse" bands (white bands on a dark background) must be evaluated as negative. The corresponding serum should in any case be tested using other serological methods.

12. Clinical results

Table 4: Sensitivity

	Number tested	Positive	Sensitivity (%)
ScI70	16	13	81
PMScl	9	6	67
ScI34	1	1	100
CENPB	45	40	89

The antigens ScI70 and CENPB are also presented on the *recomLine* ANA/ENA IgG from MIKROGEN: This test was introduced on the European market already in 2002. The reactivity of the two antigens has been confirmed in several studies and quality surveys.

Table 5: Sensitivity with clinically defined sera

	Total	positive	Sensitivity (%)
ScI70	21	18	86
CENPB	22	22	100
Total	43	40	93

Of a total of 43 clinically defined sclerodermitis patients *recomLine* Scleroderma identified 40 sera, corresponding to a sensitivity level of 93%. Three sera were not identified by *recomLine* Scleroderma. Two of these sera were not positive in any ELISA tested either. One was ScI70-positive.

Table 6: Specificity: Determined on the basis of negative sera and potentially interfering sera

	<i>recomLine</i> Scleroderma IgG		
	Total	Negative	Positive
Blood donors	100	95	5
Potential cross-reactivity EBV infections, pregnancy, positive rheumatoid factor	40	39	1
Problematical sera in laboratory routine Icteric, haemolytic and lipaemic sera	30	27	3
Other autoimmune diseases Sjögren's syndrome, systemic lupus, etc.	123	118	5
Specificity	95%		

Two additional sera provided by the Arthritis Foundation and CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA), which were specified by means of IIF and Ouchterlony immunodiffusion and were:

CDC#9 (anti-ScI70) reacts in *recomLine* Scleroderma with 2+

CDC#11 (anti-PMScl) reacts in *recomLine* Scleroderma with +

These are considered as reference sera and were confirmed in additional laboratories.






Information on the sera can be obtained from MIKROGEN. Smolen et. al provide a detailed description.

13. Literature

- (1) Conrad K. et al. **Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen.** *Pabst*2001
- (2) URL: <http://www.m-ww.de/krankheiten/hautkrankheiten/pss.html> (21.06.04)
- (3) URL: <http://www.imcl.at/aerzte/normwertekatalog/index.php?n=011&nd=04> (21.06.04)
- (4) URL: <http://www.ahc-consilium.at/daten/kollagenosenl.htm> (21.06.04)
- (5) URL: <http://www.sklerodermie-selbsthilfe.de/Wasistdas.htm> (21.06.04)
- (6) Smolen JS. et al. **Reference sera for antinuclear antibodies. II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and Western blotting.** *Arthritis Rheum* 40(3), 413-418 (1997)
- (7) Tan E.: **Autoantibodies as diagnostic markers and messengers from the immune system.** in Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies. *Pabst* 1998
- (8) Dick T. et al: **Coincidence of anti Topoisomerase I – and anti centromere antibodies in patients with systemic sclerosis.** in: Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies. *Pabst* 1998
- (9) Pruijn G.: **Autoantigenic complexes in the nucleolus of human cells.** in Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity *Pabst* 2000

We will be pleased to send you further literature on Scleroderma and connective tissue diseases at your request.

14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests amount of tests	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze Anzahl der Ansätze
EVALFORM	Evaluation form	Auswertebogen
INSTRU	Instructions for use	Gebrauchsinformation
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomLine Scleroderma IgG		Artikel-Nr./ Article No.:	6372
Gebrauchsinformation Version/ Instructions for use version:		GIRLSC004DE.DOC	
gültig ab/ valid from:		Juli/July 2007	
MIKROGEN GmbH	Tel:	+49 (0)89 54 80 1-0	
Floriansbogen 2-4	Fax:	+49 (0)89 54 80 1-100	
D-82061 Neuried			
Germany			
www.mikrogen.de	mikrogen@mikrogen.de		
QM-SYSTEM zertifiziert durch:			
QM System certified according to:			
		