

**Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testarbeit sorgfältig lesen**

## PM1-Alpha-ELISA

### ELISA für die semi-quantitative Bestimmung von anti-PM1-Alpha Antikörpern in humanem Serum oder Plasma

**REF** 25001

▽ 96 Bestimmungen

#### HINTERGRUND

Systemische Autoimmunerkrankungen sind durch zirkulierende Autoantikörper gegen intrazelluläre Bestandteile gekennzeichnet. Antikörper gegen den PM/Scl-Komplex gelten als spezifischer serologischer Marker für eine Subpopulation von Patienten mit einem Überlappungssyndrom aus systemischer Sklerose und Polymyositis (PM/Scl). Etwa 25% der PM/Scl Patienten haben anti-PM/Scl Antikörper. Mit geringer Prävalenz kommen diese Antikörper auch in Scl und PM Patienten (3-10%) vor. Der Hauptteil der anti-PM/Scl Antikörper ist gegen ein alpha-helikales Epitop gerichtet, das sich von AS 231-245 auf dem PM/Scl-100 Autoantigen erstreckt. In einer Multi-Center Studie konnte gezeigt werden, dass ein ELISA System basierend auf dem PM1-Alpha Peptid eine deutlich höhere Testeffizienz aufweist als konventionelle Nachweismethoden. 55% der Patienten mit dem PM/Scl Überlappungssyndrom und nur 6% der Kontrollpatienten wiesen Antikörper gegen das PM1-Alpha Antigen auf.

#### VERWENDUNGSZWECK

Der PM1-Alpha ELISA weist eine hochspezifische Subpopulation von Anti-PM/Scl Antikörpern nach. Er sollte zur Differentialdiagnostik im Formenkreis der Kollagenosen eingesetzt werden. Anti-PM1-Alpha Antikörper tragen zur Diagnose des PM/Scl Syndroms bei. Da Patienten mit anti-PM/Scl Antikörpern meist einen milderen Krankheitsverlauf aufweisen, haben anti-PM/Scl Antikörper möglicherweise einen prognostischen Wert.

#### TESTPRINZIP

Der PM1-Alpha ELISA weist eine hochspezifische Subpopulation von Anti-PM/Scl Antikörpern nach. Die im PM1-Alpha ELISA enthaltenen Mikrotiterplatten sind mit dem synthetischen PM1-Alpha Peptid beschichtet. Im

ersten Testschritt werden die Patientenproben (1:101), die Kontrollen und der Kalibrator (unverdünnt) in den Kavitäten inkubiert. Während dieser Zeit binden im Serum enthaltene Antikörper an das festphasengebundene PM1-Alpha Peptid. Nach einem Waschzyklus wird anti-IgG Meerrettich Peroxidase (HRP) Konjugat zugegeben, das sich spezifisch an die gebundenen IgG Moleküle anlagert. Nach einem erneuten Waschzyklus, der überschüssiges Konjugat entfernt, wird die Substratlösung zugegeben, wodurch es zur Umsetzung des Substrates, und damit zu einer Farbentwicklung kommt. Die Bildung des Farbstoffs ist direkt proportional zur Menge der gebundenen anti-PM1-Alpha Antikörper und kann spektralphotometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Ein Kalibrator mit bekannter Konzentration an anti-PM1-Alpha Antikörpern wird parallel zu den Patientenseren getestet. Durch das OD-Verhältnis zwischen dem Kalibrator und den Patientenproben können semi-quantitativ die Konzentrationen der anti-PM1-Alpha Antikörper bestimmt werden.

#### KIT KOMPONENTEN

Mikrotiterstreifen, Antigen beschichtet	<b>MICROWELL</b>	12 Streifen à 8 wells
Anti-IgG HRP-Konjugat	<b>CONJ HRP G</b>	1 x 15 mL
Waschpuffer-Konzentrat	<b>WASHBUF B 25x</b>	1 x 50 mL
TMB Substrat	<b>SUB TMB</b>	1 x 15 mL
Stopplösung (0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	<b>STOP H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1 x 12 mL
Verdünnungspuffer	<b>DILBUF B</b>	1 x 60 mL
Kalibrator	<b>CAL</b>	1 x 2 mL
Negativkontrolle	<b>CONTROL -</b>	1 x 2 mL
Positivkontrolle	<b>CONTROL +</b>	1 x 2 mL

## BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Pipetten: 2 – 10 µL, 10 – 100 µL, 200 – 1000 µL, Multipipette, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung, graduierter Messzylinder, Abdeckfolie, Mikrotiterplattenphotometer, Mikrotiterplattenwascher (optional).

## PROBENVORBEREITUNG

Für den Test kann entweder Serum oder Plasma eingesetzt werden. Es sind keine Konservierungsmittel für die Proben erforderlich.

Nach der Blutabnahme müssen die Proben bei 2-8°C aufbewahrt und nach Möglichkeit innerhalb von 48 Stunden getestet werden. Ist dies nicht möglich, oder müssen die Proben verschickt werden, sollten die Proben eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Eingefrorene Proben bei Raumtemperatur (RT; 20-25°C) auftauen und vor Gebrauch gründlich mischen. Lipämische und hämolytische Seren dürfen nicht verwendet werden.

## REAGENZIVORBEREITUNG

Alle Proben und Reagenzien sind vor ihrem Gebrauch auf RT zu bringen.

Nicht benötigte Teststreifen sind mit dem Trockensäckchen im sorgfältig verschlossenen Aluminiumbeutel aufzubewahren.

**Verdünnungspuffer:** gebrauchsfertig  
**Kalibrator und Kontrollen:** gebrauchsfertig  
**Enzymkonjugat:** gebrauchsfertig  
**Substratlösung:** gebrauchsfertig  
**Stopplösung:** gebrauchsfertig

### Waschpufferkonzentrat:

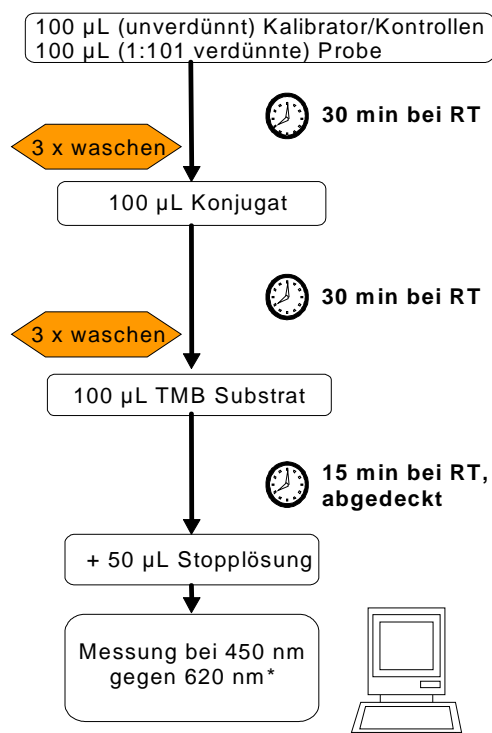
Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:25 verdünnt (Beispiel: Pro Streifen werden 40 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu 1,6 mL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf 40 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

## TESTDURCHFÜHRUNG

1. Zunächst muss ein Testprotokoll erstellt werden. Der Kalibrator wird in Doppelbestimmung gemessen, was auch für die Proben und Kontrollen empfohlen wird.
2. Patientenproben **1:101** mit Verdünnungspuffer verdünnen (10 µL Serum + 1 mL Verdünnungspuffer bei Doppelbestimmung / 5 µL Serum + 0,5 mL Verdünnungspuffer bei Einzelbestimmung).
3. Benötigte Antigen-beschichtete Kavitäten in einen Rahmen einsetzen. Aluminiumbeutel mit verbleibenden Streifen und Trockensäckchen anschließend wieder gut verschließen.
4. 100 µL des Kalibrators, der Kontrollen und der verdünnten Patientenproben gemäß des Testprotokolls in die mit Antigen beschichteten Kavitäten pipettieren.

5. Die Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
6. Nach der Inkubation den Inhalt aus den Kavitäten absaugen und 3-mal mit mindestens je 300 µL Waschpuffer/Kavität waschen. Die Waschschriffe können manuell oder mit einem validierten Mikrotiterplatten-Washer durchgeführt werden. Restflüssigkeit durch Ausklopfen entfernen.
7. 100 µL Anti-IgG-HRP Konjugat in jede Kavität pipettieren. Die Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
8. Platte waschen wie unter Punkt 6 beschrieben.
9. 100 µL TMB Substrat in jede Kavität pipettieren und die Platte abgedeckt 15 min bei RT inkubieren (TMB ist lichtempfindlich).
10. In jede Kavität je 50 µL Stopplösung in gleicher zeitlicher Reihenfolge wie bei der Substratzugabe pipettieren. Es empfiehlt sich, die Lösung in den Kavitäten durch leichtes Klopfen gegen den Rahmen der Platte zu mischen. Anschließend Platte bei 450 nm in einem geeigneten ELISA-Reader messen (Referenzwellenlänge 620 nm\*). Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen werden wie auf Seite 3 beschrieben berechnet.

## TESTSCHEMA AI-LINE ELISA



\* Die Messung gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm kann optional erfolgen.



**DR. FOOKE**

Laboratorien GmbH Tel.: 0049-2131-2984-0  
Habichtweg 16 Fax: 0049-2131-2984-184  
4 1 4 6 8 Neuss  
E-mail: information@fooke-labs.de  
Internet: www.fooke-labs.de

## BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD [ $\Delta$  450 nm – 620 nm] Werte jeder Patientenprobe sowie der Kontrollen werden durch den OD Mittelwert des Kalibrators dividiert und mit dem Berechnungsfaktor multipliziert. Der **Berechnungsfaktor (F)** ist chargenabhängig und wird dem **Qualitätskontrollzertifikat (QKZ)** der jeweiligen Kitcharge entnommen. Daraus ergibt sich das zu interpretierende Ergebnis der Patientenprobe. Bei den Werten handelt es sich um relative Einheiten (*relative units*) die abgekürzt als RU angegeben werden.

*Berechnung nach der Formel*

$$RU \text{ Patientenprobe} = \frac{OD \text{ Probe}}{OD \text{ Kalibrator}} \times F$$

*Beispielrechnung:*

OD Kalibrator	= 1,9
OD Probe	= 0,6
Berechnungsfaktor F	=10

$$RU \text{ Patientenprobe} = \frac{OD \text{ Probe}}{OD \text{ Kalibrator}} \times 10$$

*Einsetzen der Werte:*

$$RU \text{ Patientenprobe} = \frac{0,6}{1,9} \times 10$$

$$RU \text{ Patientenprobe} = 3,2 \text{ RU}$$

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Zur Interpretation bzw. Bewertung der Testergebnisse wird folgende Werteskala verwendet.

< 1 RU	Negativ
1-1,5 RU	Grenzwertig
> 1,5 RU	Positiv

Die Grenzwerte wurden anhand von Krankheitskontrollen und gesunden Blutspendern ermittelt

## TESTGÜLTIGKEITSKRITERIEN

Der Vertrauensbereich für den Kalibrator (in OD) muss im Bereich der im QK-Zertifikat (QKZ) angegebenen Werte liegen. Die RU für die Kontrollen müssen im Akzeptanzbereich der auf dem QKZ angegebenen Werte liegen. Andernfalls sind die Testbedingungen zu überprüfen und der Test gegebenenfalls zu wiederholen.

## ERWARTUNGSWERTE

Der Durchschnitt bei gesunden Blutspendern wurde mit 0,3 RU (Standardabweichung 0,1 RU) bestimmt. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwerte festlegen.

## MESSBEREICH

Dieser Test erfasst 0,1 bis 10 relative Einheiten (RU).

## PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit wurden an 3 Seren überprüft. Die **Intra**-Assay-Varianz lag bei 4-fach-Bestimmung unter einem VK von 7%.

Für die **Inter**-Assay-Varianz wurden aus 3 unterschiedlichen Läufen Doppelbestimmungen herangezogen. Der VK lag unter 10%.

## SPEZIFITÄT

Die klinische Spezifität dieses Tests beträgt für das Overlap-Syndrom 89,5 %.

## SENSITIVITÄT

Die relative Sensitivität dieses Tests zu Immunfluoreszenstests beträgt 97%, die klinische Sensitivität beträgt 55% bei einem cut-off von 1,5.

## LITERATUR

1. Tan EM: **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.** *Adv Immunol* 1989, **44**:93-151.
2. Blüthner M, Mahler M, Muller DB, Dünzl H, Bautz FA: **Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/Scl-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides.** *J Mol Med* 2000, **78**:47-54.
3. Mahler M, Raijmakers R, Dähnrich C, Bluethner M, Fritzler MJ: **Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:704-713.
4. Mahler M, Raijmakers R: **Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights.** *Autoimmun Rev* 2007, **6**:432-437.
5. Mahler M, Ngo J, Schulte-Pelkum J, Luettich T, Fritzler MJ: **Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:R131.
6. Mahler M, Fritzler MJ: **PM1-Alpha ELISA: The assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies?** *Autoimmun Rev* 2009, **8**:373-378.

## WICHTIGE HINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von *in-vitro*-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit zu gewährleisten. Daher sind die vom Hersteller festgelegten Zweckbestimmungen vom autorisierten Anwenderkreis zu beachten. Dieser Testkit ist ausschließlich für die im Verwendungszweck (siehe Seite 1) angegebene Zweckbestimmung vorgesehen.
- Der Test ist nach dieser Gebrauchsanweisung durchzuführen, die alle notwendigen Informationen, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise enthält. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode erweitert zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Das Produkt darf nur von geschultem Fachpersonal angewendet werden. Schwangere sollten den Test nicht durchführen.
- Verwendete Geräte sind gemäß den Herstellerangaben regelmäßig zu warten und vor ihrem Gebrauch auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen.
- Die Reagenzien sind nur für *in-vitro*-Diagnostik und zum Einmalgebrauch bestimmt. Reagenzien, deren Verfallsdatum überschritten ist, dürfen nicht verwendet werden. Keine Reagenzien anderer Hersteller oder Kitkomponenten unterschiedlicher Chargen (Ausnahmen s. Seite 1) mit den Reagenzien dieses Testkits kombinieren.
- Kitkomponenten nicht benutzen, wenn die Verpackung der Komponenten beschädigt ist. Vor Gebrauch alle Lösungen optisch auf mikrobielle Kontamination prüfen. Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht vertauschen.
- Der Testkit wurde validiert für die im Testschema (siehe Seite 2) angegebenen Temperaturen. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen können die Ergebnisse von den Referenzbereichen abweichen.
- Die Waschprozedur ist von entscheidender Bedeutung. Unzureichendes Waschen führt zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Verwendung von Multi- bzw. Mehrkanalpipetten und automatischen Washern wird empfohlen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren. Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Testkomponenten humanen Ursprungs (Kalibratoren und Kontrollen) wurden mit CE-gekennzeichneten Methoden auf Anti-HIV-1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Ungeachtet dieser Resultate sollten alle Reagenzien auf Humanserumbasis als potentiell infektiös (biogefährdend) betrachtet werden.
- Einige Kitkomponenten können Rinderserumalbumin enthalten, von dem laut Lieferant keine Infektiösität bekannt ist. Da möglicherweise nicht nachweisbare infektiöse Agentien vorhanden sein könnten, wird empfohlen, generell alle Produkte tierischer Herkunft als potentiell infektiös zu betrachten.
- Auf folgende Sicherheitsbestimmungen für alle Reagenzien wird besonders hingewiesen:
  - Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen (P262). Aerosol nicht einatmen (P 260). Niemals mit dem Mund, sondern nur mit genormten Pipettierhilfen pipettieren.
  - BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen (P301/330/331).
  - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen (P303/361/353).
  - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert (P304/340).
  - BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen (P305/351/338).
  - Essen, Rauchen und Trinken während der Arbeit ist nicht gestattet. Reagenzien von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fern halten.
  - Während der Arbeit mit Kitreagenzien oder Patientenproben Kittel, Schutzbrille und Einmalhandschuhe tragen (P280). Nach der Arbeit die Hände gründlich waschen (P264).
  - Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich.
- Stopplösung verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden (H314).
- Möglicherweise ist TMB in hohen Konzentrationen potentiell mutagen. Aufgrund der geringen Konzentration von TMB in der Substratlösung ist eine mutagene Wirkung bei ordnungsgemäßem Gebrauch ausgeschlossen.
- Die enthaltenen Konservierungsmittel (Bronidox L, Thimerosal, Azid) sind giftig für Wasserorganismen, haben aber keine gewässergefährdende Konzentration mehr. Große Mengen Reagenzien sollten vor der Beseitigung mit Wasser verdünnt werden. Thimerosal (WashBuf B) kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition (H373).
- Serumhaltige Abfälle müssen in Abfallbehältern gesammelt werden, die ein geeignetes Desinfektionsmittel in ausreichender Konzentration enthalten. Abfälle müssen entsprechend den Regularien des jeweiligen Landes behandelt werden.
- Wir weisen auf die Medizinproduktebetreiber-Verordnung, die Richtlinie der Bundesärztekammer (RiliBÄK) in ihrer aktuellen Version und auf die „Gute Labordiagnostische Praxis, GLDP“ hin.



**DR . FOOKE**

Laboratorien GmbH

Habichtweg 16

4 1 4 6 8 Neuss

E-mail: [information@fooke-labs.de](mailto:information@fooke-labs.de)

Internet: [www.fooke-labs.de](http://www.fooke-labs.de)

Tel.: 0049-2131-2984-0

Fax: 0049-2131-2984-184

Los-Nummer	CE-Konformitätskennzeichnung	In-vitro Diagnostikum	Temperaturbegrenzung	Verwendbar bis	Bestellnummer	Gebrauchsanweisung beachten	Begleitdokumente beachten	Nicht benutzen, wenn die Verpackung zerstört ist	Einmalgebrauch	Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	Hergestellt von	Biogefährdend