

Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testarbeit sorgfältig lesen

ANA Screen ELISA

ELISA für die semi-quantitative Bestimmung von anti-nukleären Antikörpern in humanem Serum oder Plasma

REF

25012



96 Bestimmungen

HINTERGRUND

Ein charakteristisches Merkmal von systemischen Autoimmunerkrankungen sind zirkulierende Autoantikörper gerichtet gegen intrazelluläre Strukturen, insbesondere gegen Antigene aus dem Zellkern. Zu den wichtigsten Autoantigenen gehören: Doppelstrang DNA (dsDNA), Ro52, Ro60, La, Zentromerproteine, Scl-70 (topoisomerase I, topo I), RNP/Sm, Sm, Jo-1 und PM/Scl. Viele dieser Autoantigene gelten als spezifischer Marker für eine bestimmte Autoimmunerkrankung, während andere eine geringere Krankheitsspezifität aufweisen (siehe Tabelle 1). Da in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) einige klinisch relevante Autoantikörper (z.B. Ro60, Jo-1) nur schwer detektierbar sind, stellt der ANA Screen eine sinnvolle Alternative zur IIF dar.

VERWENDUNGSZWECK

Der ANA Screen ELISA ist zur semi-quantitativen Detektion von anti-nukleären Antikörpern (ANAs) bestimmt und trägt somit zur Diagnostik von systemischen Autoimmunerkrankungen bei. Der Test sollte als initialer Suchtest eingesetzt werden.

Tabelle 1 Autoantigene und klin. Assoziationen

Antigen	Krankheitsassoziation
dsDNA ^(r)	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
Ro52 ^(r)	SLE, SjS, SSc
Ro60 ^(r)	Sjögren Syndrom (SjS)
La ^(r)	Sjögren Syndrom (SjS)
RNP/Sm ⁽ⁿ⁾	Mischkollagenose
Sm ⁽ⁿ⁾	SLE
Jo-1 ^(r)	Polymyositis (PM)
Scl-70 ^(r)	Systemische Sklerose (SSc)
CENP ^(r)	Systemische Sklerose (SSc)
PM1-Alpha ^(s)	PM/SSc Überlappungssyndrom

r= rekombinant, n= nativ, s= synthetisch

TESTPRINZIP

Die im ANA Screen ELISA enthaltenen Mikrotiterplatten sind mit einer Mischung aus nativen, rekombinanten und synthetischen Antigenen beschichtet. Zu Beginn werden die Patientenproben (1:101 verdünnt), die Kontrollen und der Kalibrator

(unverdünnt) in den Kavitäten inkubiert. Während dieser Zeit binden im Serum enthaltene anti-nukleäre Antikörper an die festphasengebundenen Antigene. Nach einem Waschzyklus wird anti-IgG Meerrettich Peroxidase (HRP) Konjugat zugegeben, das spezifisch an die ANAs bindet. Nach einem erneuten Waschzyklus zur Entfernung des überschüssigen Konjugates wird die Substratlösung zugegeben. Dadurch kommt es zur Umsetzung des Substrates, und somit zu einer blauen Farbentwicklung. Durch Zugabe der Stopplösung schlägt die Färbung von blau nach gelb um. Die Bildung des Farbstoffs ist direkt proportional zur Menge der gebundenen ANAs und kann spektral-photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Parallel zu den Patientenproben wird ein Kalibrator mit bekannter Konzentration an ANAs getestet. Durch das Verhältnis der optischen Dichte (OD) zwischen dem Kalibrator und den Patientenproben können die Konzentrationen der ANAs semi-quantitativ bestimmt werden.

KIT KOMPONENTEN

Mikrotiterstreifen, Antigen beschichtet	MICROWELL	12 Streifen à 8 wells
Anti-IgG HRP-Konjugat	CONJ HRP G	1 x 15 mL
Waschpuffer-Konzentrat	WASHBUF B 25x	1 x 50 mL
TMB Substrat	SUB TMB	1 x 15 mL
Stopplösung (0,5 M H ₂ SO ₄)	STOP H₂SO₄	1 x 12 mL
Verdünnungspuffer	DILBUF B	1 x 60 mL
Kalibrator	CAL	1 x 2 mL
Negativkontrolle	CONTROL -	1 x 2 mL
Positivkontrolle	CONTROL +	1 x 2 mL

BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Pipetten: 2 – 10 µL, 10 – 100 µL, 200 – 1000 µL, Multipette, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung, graduierter Messzylinder, Abdeckfolie, Mikrotiterplattenphotometer, Mikrotiterplattenwasher (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) auf tauen 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:

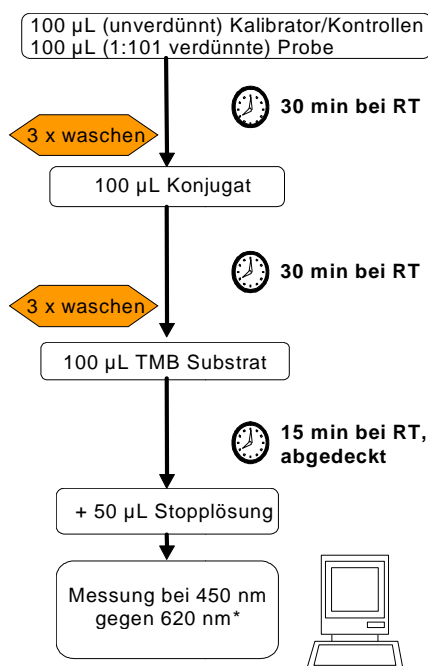
Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:25 verdünnt (Beispiel: Pro Streifen werden 40 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu 1,6 mL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf 40 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

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 Waschschrte 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 [Δ 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 0,7 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 8 unterschiedlichen Läufen Doppelbestimmungen herangezogen. Der VK lag unter 10%.

SPEZIFITÄT

Die klinische Spezifität gemessen in einem kaukasischen SLE Kollektiv gegen gesunde Blutspender beträgt 100,0%.

SENSITIVITÄT

Die klinische Sensitivität für SLE in einem kaukasischen SLE Kollektiv beträgt 64,0% (> 1,5 RU) und 86,5% (> 1,0).

LITERATUR

1. Tan EM: **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.** *Adv Immunol* 1989, **44**:93-151.
2. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F: **Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests.** *Clin Chem* 2002, **48**:2171-2176.
3. Mahler M, Rajmakers R, Fritzler MJ: **Challenges and Controversies in Autoantibodies Associated with Systemic Rheumatic Diseases.** *Curr Rheumatol Rev* 2007, **12**:67-78.

WICHTIGE HINWEISE

- Gemäß Anhang I 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 Humanerumbasis 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 VERSCHLÜCKEN: 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) und Haut pflegen.
 - 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 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

Los- Nummer	CE- Konformitäts kenn- zeichnung	<i>In-vitro</i> Diagnos- tikum	Temperatur- begrenzung	Verwend- bar bis	Bestell- nummer	Gebrauchs- anweisung beachten	Begleit- dokumente beachten	Nicht benutzen, wenn die Ver- packung zerstört ist	Einmal- gebrauch	Inhalt aus- reichend für <n> Prüfungen	Herge- stellt von	Bioge- fährdend