

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

## ENA Profil 8 ELISA

**ELISA für die semi-quantitative Bestimmung von Autoantikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) in humanem Serum oder Plasma**



25023



8 x 12 Bestimmungen

### HINTERGRUND

Ein charakteristisches Merkmal von systemischen Autoimmunerkrankungen sind zirkulierende Autoantikörper (AAK) gerichtet gegen intrazelluläre Strukturen, die häufig auch als extrahierbare nukleäre Antigene (ENAs) zusammengefasst werden. Zu den wichtigsten Autoantigenen gehören: Doppelstrang DNA (dsDNA), Ro, La, Zentromerproteine (CENP), Scl-70 (topoisomerase I), das Smith Antigen (Sm), Ribonukleoproteine (RNP), Jo-1 und PM/Scl. AAK gegen den dsDNA und den Sm Komplex gelten als hoch-spezifische Marker für den systemischen Lupus erythematoses (SLE) und können im Serum von 5-30% (Sm) und 20-70% (dsDNA) der Patienten nachgewiesen werden. Anti-RNP Antikörper gelten als SLE assoziierte AAK die auch in anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen vorkommen. Die systemische Sklerose (SSc) ist durch anti-Scl-70 und anti-CENP AAK charakterisiert. AAK gegen Ro52 und La (SS-B) können in Patientenseren mit SLE, Sjögren Syndrom (SjS), Mischkollagenosen (MCTD) und SSc nachgewiesen werden. Anti-Jo-1 AAK wurden erstmalig im Serum eines Patienten mit Myositis beschrieben.

### VERWENDUNGSZWECK

Der ENA Profil 8 ELISA ist zur semi-quantitativen Detektion von ENAs bestimmt und trägt somit zur Diagnostik von systemischen, rheumatischen Autoimmunerkrankungen bei.

Reihe	ENA	Krankheitsassoziation	Prävalenz
A	dsDNA	SLE	20-70%
B	RNP/Sm	SLE, MCTD, SSc	5-30%
C	Sm	SLE	5-20%
D	Ro52	SLE, SjS, SSc	20-90%
E	La (SS-B)	SLE, SjS	10-30%
F	Scl-70	SSc	20-40%
G	CENP-B	SSc	10-20%
H	Jo-1	Myositis	20-40%

### TESTPRINZIP

Der ENA Profil 8 ELISA enthält Mikrotiterstreifen (8 x 12 Kavitäten), die jeweils mit acht verschiedenen Antigenen beschichtet sind (siehe Tabelle).

Zu Beginn werden die Patientenproben (1:101 verdünnt), die Kontrolle und der Kalibrator (unverdünnt) in den Kavitäten inkubiert. Während dieser Zeit binden im Serum enthaltene ENAs an die festphasengebundene Antigene. Nach einem Waschzyklus wird anti-IgG Meerrettich Peroxidase (HRP) Konjugat zugegeben, das spezifisch an die ENAs 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 ENAs und kann spektralphotometrisch bei 450 nm bestimmt werden.

Parallel zu den Patientenproben wird ein Kalibrator mit bekannter Konzentration an ENAs getestet. Durch das Verhältnis der optischen Dichte (OD) zwischen dem Kalibrator und den Patientenproben können die Konzentrationen der ENAs semi-quantitativ bestimmt werden.

### KIT KOMPONENTEN

Mikrotiterstreifen, Antigen beschichtet	<b>MICROWELL</b>	Je 8 Antigene pro Streifen
Anti-IgG HRP-Konjugat	<b>CONJ HRP G</b>	1 x 12 mL
Waschpuffer-Konzentrat	<b>WASHBUF B 25x</b>	1 x 50 mL
TMB Substrat	<b>SUB TMB</b>	1 x 12 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, Multipette, 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.

## REAGENZENVORBEREITUNG

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:

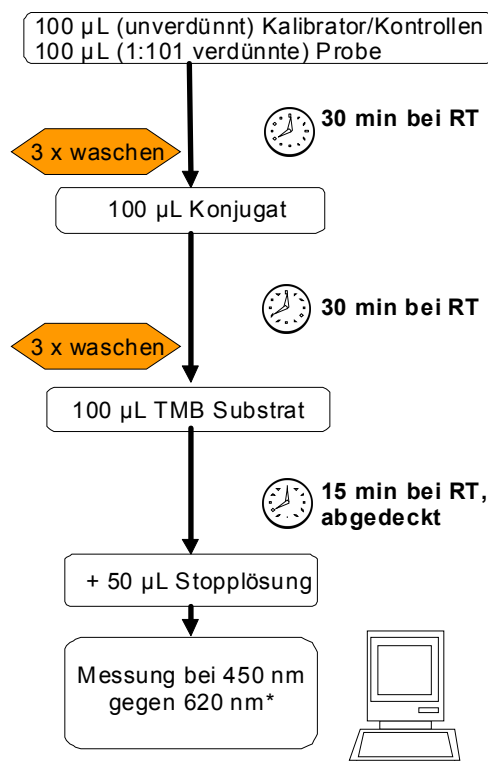
Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:25 verdünnt (Beispiel: Pro Streifen werden 40 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu 1,6 mL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf 40 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

## TESTDURCHFÜHRUNG

1. Zunächst muss ein Testprotokoll erstellt werden. Der Kalibrator und mind. eine Kontrolle werden in Einzelbestimmung getestet.
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. Je 100 µL des Kalibrators, der Kontrollen und der verdünnten Patientenproben gemäß des Testprotokolls in jede Kavität eines mit Antigen beschichteten Streifens 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](mailto:information@fooke-labs.de)  
Internet: [www.fooke-labs.de](http://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 parameterspezifisch und wird dem **Qualitätskontrollzertifikat** 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:

$$\begin{aligned} OD \text{ Kalibrator} &= 1,9 \\ OD \text{ Probe} &= 0,6 \\ \text{Berechnungsfaktor } F &= 10 \end{aligned}$$

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

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 für jeden Parameter 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 Testbe-

dingungen zu überprüfen und der Test gegebenenfalls zu wiederholen.

## ERWARTUNGSWERTE

Der Durchschnitt von gesunden Blutspendern wurde wie folgt bestimmt. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwerte festlegen.

PARAMETER	Mittelwert	Standardabweichung
dsDNA	0,4	0,2
RNP/Sm	0,4	0,2
Sm	0,5	0,2
SS-A / Ro52	0,3	0,1
La (SS-B)	0,2	0,1
Scl-70	0,4	0,2
CENP-B	0,2	0,1
Jo-1	0,3	0,1

## 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 mind. 3 unterschiedlichen Läufen Doppelbestimmungen herangezogen. Der VK lag unter 10%.

## SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Antigen	Sensitivität	Spezifität
dsDNA	100% <sup>1</sup>	100% <sup>1</sup>
RNP/Sm	96% bzw. 100% <sup>1</sup>	89,5% <sup>1</sup>
Sm	11,2% <sup>2</sup>	98,8% <sup>1</sup>
Ro52	78,9% <sup>2,3</sup>	100% <sup>1</sup>
La (SS-B)	14,8% <sup>2,4</sup>	100% <sup>1</sup>
Scl-70	22% <sup>2</sup>	100% <sup>2</sup>
CENP-B	100% <sup>1</sup>	97,9% <sup>1</sup>
Jo-1	92% <sup>1</sup>	99% <sup>1</sup>

<sup>1</sup> analytisch, <sup>2</sup> klinisch, <sup>3</sup> in SjS, <sup>4</sup> in SjS

## WEITERFÜHRENDE LEISTUNGSMERKMALE

Weiterführende Leistungsmerkmale sind den Gebrauchsanweisungen und Produktinformationen der Einzelparameter (REF: 25003, 25004, 25005, 25006, 25008, 25009, 25010, 25011) zu entnehmen.

## LITERATUR

1. Tan EM: **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.** *Adv Immunol* 1989, **44**:93-151.
2. 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 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 ordnungsgemäßigem 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