



ElisaRSR™ AQP4 Ab Version 2
Aquaporin-4 (AQP4) Autoantibody
ELISA Version 2 Kit –
Gebrauchsanweisung



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff

CF14 5DU United Kingdom

Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

Email: info@rsrltd.com

Website: www.rsrltd.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Fl.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

ZWECKBESTIMMUNG

Das RSR AQP4 Autoantibody ELISA Version 2 Kit ist zur quantitativen Bestimmung von AQP4 Autoantikörpern (AQP4 Ak) in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Neuromyelitis Optica (NMO), auch bekannt als Devic-Syndrom, ist eine immunvermittelte neurologische Erkrankung, die das Rückenmark und die Sehnerven betrifft. Sie kann als eine von Multipler Sklerose (MS) unterscheidbare Erkrankung betrachtet werden. Ein Serum-Immunglobulin-G-Autoantikörper (NMO-IgG) hat sich als spezifischer Marker für NMO erwiesen, und das Wasserkanal-Aquaporin 4 (AQP4) wurde als Antigen für NMO-IgG identifiziert. Die Bestimmung von AQP4-Ak kann bei der Unterscheidung von NMO und MS von erheblichen Wert sein, wenn die vollständigen klinischen Merkmale möglicherweise nicht offensichtlich sind und ein frühzeitiges Eingreifen eine Invalidität verhindern oder verzögern kann.

LITERATURLISTE

V. A. Lennon et al.

A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis.

Lancet 2004 364(9451): 2106 - 2112

V. A. Lennon et al.

IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel.

The Journal of Experimental Medicine 2005 202: 473 - 477

B. G. Weinshenker et al.

Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis.

Annals of Neurology 2006 59: 566 - 569

N. Isobe et al.

Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica.

Multiple Sclerosis Journal 2012 18: 1541 - 155

S. Jarius et al.

Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: Sensitivity, specificity and direct comparison with immunohistochemistry.

Journal of the Neurological Sciences 2012 320: 32 - 37

PATENTE

Es gelten folgende Patente:

Europäisches Patent EP 1 700 120 B1, US Patente

US 7,101,679 B2, US 7,947,254 B2 und US

8,889,102 B2, chinesisches Patent

ZL200480040851.3 und japanisches Patent 4538464.

TESTPRINZIP

Im AQP4 Ab ELISA Version 2 Kit von RSR können AQP4-Ak in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen mit AQP4, gebunden in Vertiefungen einer EISA-Platte, und biotinyliertem AQP4 (AQP4-Biotin) in flüssiger Phase interagieren. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wird der Inhalt der Vertiefungen verworfen. Die AQP4-Ak in den Proben binden divalent das in der Vertiefung beschichtete AQP4 sowie das AQP4-Biotin in der flüssigen Phase und binden dadurch als AQP4-Ak-Brücke das AQP4-Biotin an die Vertiefung. Um die Menge an gebundenem AQP4-Biotin zu bestimmen, wird in einem zweiten Inkubationsschritt Streptavidin-Peroxidase (SA-POD) zugegeben, die spezifisch an Biotin bindet. Überschüssige, ungebundene Streptavidin-Peroxidase wird dann gewaschen und die Zugabe des Peroxidase-Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) resultiert in der Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch die Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wobei sich der Inhalt der Vertiefungen gelb färbt. Die Extinktion der gelben Reaktionsmischung bei 450nm und 405nm wird dann unter Verwendung eines ELISA-Plattenlesegeräts bestimmt. Eine höhere Extinktion weist auf das Vorhandensein von AQP4-Autoantikörper in der Testprobe hin. Die Messung bei 405nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Extinktionen. Es wird empfohlen, Werte unter 10 E/mL bei 450nm zu messen. Wenn bei nur einer Wellenlänge messen werden kann, können 405nm verwendet werden. Das Messintervall beträgt 3,0 - 80 E/mL (E = beliebige RSR-Einheiten).

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet oder, vorzugsweise in Aliquots, bei oder unter -20°C gelagert werden. 100 µL reichen für einen Assay (Doppelbestimmungen mit je 50 µL). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen in der Lagertemperatur sollten vermieden werden. Lipämische oder hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden. Studien, in denen EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasmaproben mit AQP4-Ak-positiven Seren versetzt wurden, zeigten geringfügige Signaländerungen im Vergleich zu gespiktem Serum desselben Spenders. Insbesondere OD₄₅₀-Werte mit gespiktem EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasma betragen 79% - 128% des gespikten Serums (15 Proben mit Serumkonzentrationen im Bereich von 2,6 E/mL - 30 E/mL) oder 87% - 130% in Bezug auf E/mL.

Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Zentrifugieren Sie das Serum vor dem Assay (vorzugsweise für 5 min bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht weg, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

SYMBOLE

Symbol	Bedeutung
	EG- Konformitätserklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für X Bestimmungen
	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Negative Control
	Positive Control

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

Pipetten zum Dispensieren von 25 µL, 50 µL und 100 µL.

Gefäße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien.

Reinstwasser.

ELISA-Plattenleser, geeignet für 96-Well-Formate und in der Lage, bei 450nm und 405nm zu messen.

ELISA-Plattenschüttler mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschüttler).

ELISA-Plattenabdeckung.

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und alle Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

A	AQP4 Coated Wells 12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen (insgesamt 96) in einem Rahmen und in einem Folienbeutel versiegelt. Vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.
	Stellen Sie sicher, dass die benötigten Vertiefungen fest in den mitgelieferten Rahmen eingepasst sind. Nach dem Öffnen unbenötigte Vertiefungen wieder in den mitgelieferten Original-Folienbeutel mit Trockenmittel geben und mit Klebeband verschließen. Den Folienbeutel in den mitgelieferten selbstverschließenden Plastikbeutel legen und bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagern.

B1-5	Calibrators 1,5; 5; 20; 40; 80 u/mL (= E/mL, willkürlich festgelegte RSR Einheiten) 5 x 0,7 mL Gebrauchsfertig.
C1-2	Positive Controls I & II (Siehe Etikett für Konzentrationsbereich) 2 x 0,7 mL Gebrauchsfertig.
D	Negative Control 0,7 mL Gebrauchsfertig.
E	AQP4-Biotin 3 Fläschchen Lyophilisiert Unmittelbar vor Gebrauch jedes Fläschchen mit 1,5 mL Reconstitution Buffer for AQP4-Biotin (F) rekonstituieren. Wenn mehr als ein Fläschchen verwendet wird, die Fläschchen poolen und vorsichtig mischen.
F	Reconstitution Buffer for AQP4-Biotin 10 mL Gebrauchsfertig.
G	Streptavidin Peroxidase (SA-POD) 0,8 mL Konzentrat Vor Gebrauch 1:20 mit Diluent for SA-POD (H) verdünnen. Zum Beispiel 0,5 mL (G) + 9,5 mL (H). Nach dem Verdünnen bis zu 16 Wochen bei 2-8°C lagerbar.
H	Diluent for SA-POD 15 mL Gebrauchsfertig.
I	Peroxidase Substrate (TMB) 15 mL Gebrauchsfertig.
J	Concentrated Wash Solution 120 mL Konzentrat Vor Gebrauch 1 in 10 mit Reinstwasser verdünnen. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagerbar.
K	Stop Solution 14 mL Gebrauchsfertig.

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Das AQP4-Biotin nicht vor Schritt 2 (s. unten) rekonstituieren. Für die Schritte 2, 5, 8 und 9 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

1.	Je 50 µL (Doppelbestimmung wird empfohlen) Patientenseren, Calibrators (B1-5) und Controls (C1-2 und D) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung leer lassen (= Blank).
2.	Das AQP4-Biotin rekonstituieren und je 25 µL in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.

3.	Die Vertiefungen abdecken und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler schütteln (500 rpm).
4.	Einen ELISA-Plattenwascher verwenden, um die Vertiefungen dreimal abzusaugen und mit verdünnter Wash Solution (J) zu waschen. Sollte kein Plattenwascher verfügbar sein, den Inhalt der Vertiefungen entleeren durch rasches Umdrehen über einem geeigneten Behälter, dreimal manuell waschen und abschließend die Vertiefungen umgedreht auf einem sauberen, trockenen, saugfähigen Tuch vorsichtig ausklopfen, um Reste der Wash Solution zu entfernen.
5.	Je 100 µL des verdünnten SA-POD (G) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
6.	Die Vertiefungen abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) inkubieren.
7.	Waschschritt 4 wiederholen. Sollte manuell gewaschen werden, beim letzten Waschschritt Reinstwasser verwenden (um Schaum zu entfernen), bevor die Vertiefungen trockengeklopft werden.
8.	Je 100 µL TMB (I) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubieren.
9.	Je 100 µL Stop Solution (K) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und die Platte ca. 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln. Die Dauer der Substratinkubation sollte bei allen Vertiefungen gleich lang sind.
10.	Innerhalb von 10 Minuten die Extinktion jeder Vertiefung bei 450nm und 405nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät bestimmen, dabei bei jeder Vertiefung den Wert des Blanks abziehen (Vertiefung mit nur 100 µL TMB (I) und 100 µL Stop Solution (K)).

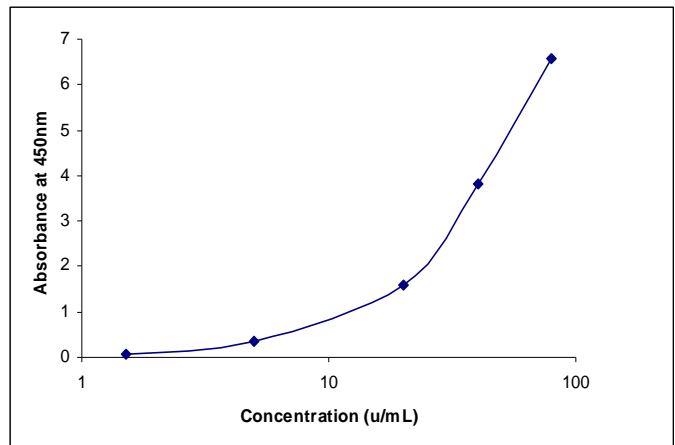
TESTAUSWERTUNG

Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die Konzentration der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen wird. Die AQP4-Ak-Konzentrationen in Patientenseren können dann aus der Kalibrationskurve [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glättungsfaktor = 0)] abgelesen werden. Andere Datenreduktionssysteme können verwendet werden. Der Negative Control kann ein Wert von 0,15 E/mL zugewiesen werden, im Rahmen einer computergestützten Verarbeitung der Testergebnisse. Proben mit AQP4-Ak-Konzentrationen über 80 E/mL können mit AQP4-Ak-negativem Serum verdünnt werden (z. B. 10x und/oder 100x). Es kann vorkommen, dass einige Seren sich nicht linear verdünnen.

TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

	A450 nm	Conc. E/mL	A405 nm	Conc. E/mL
Negative Control (D)	0,021		0,006	
B1	0,085	1,5	0,024	1,5
B2	0,354	5	0,108	5
B3	1,577	20	0,468	20
B4	3,802	40	1,118	40
B5	6,588	80	1,938	80
Positive Control (CI)	0,755	12,1	0,224	12,0
Positive Control (CII)	2,506	28	0,745	28

Extinktionswerte bei 405nm können in 450nm Extinktionswerte umgerechnet werden, indem sie mit einem entsprechenden Faktor multipliziert werden (3,4 im Fall von bei RSR verwendeten Geräten).



ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 3.0 E/mL
Positiv	≥ 3.0 E/mL

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für AQP4-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

KLINISCHE BEWERTUNG

(Die folgenden Informationen stammen aus 450nm-Daten)

Klinische Spezifität

Seren von 358 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im AQP4 Ab ELISA Version 2 Kit getestet. 356 (99%) Seren wurden als negativ für AQP4-Ak identifiziert.

Klinische Sensitivität

Von 62 Seren von Patienten mit NMO oder NMO-Spektrum-Störung (NMOSD) waren 48 (77%) positiv für AQP4-Ak.

Untere Nachweisgrenze

Die Negativkontrolle wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 0,17 E/mL.

Intra Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n = 25)	VK (%)
1	3,9	7,7
2	7,0	8,6
3	28	3,2
4	58	3,1

Inter Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n = 20)	VK (%)
A	5,0	15,6
B	13,3	10,5
C	35	7,9
D	59	7,5

Klinische Genauigkeit

Die Analyse von 205 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) zeigte keine Interferenz durch Autoantikörpern gegen TSH-Rezeptor (n = 110), Glutaminsäuredecarboxylase (n = 26), 21-Hydroxylase (n = 12), Acetylcholinrezeptor (n = 10), Schilddrüsenperoxidase (n = 15), Thyreoglobulin (n = 10), IA-2 (n = 7) oder Rheumafaktor (n = 15) im RSR AQP4 Ab ELISA Version 2.

Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit den folgenden Substanzen versetzt wurden: Bilirubin bei 20 mg/dL oder Intralipid bis zu 3000 mg/dL. Eine Interferenz wurde durch Hämoglobin bei 500 mg/dL beobachtet.

SICHERHEITSHINWEISE

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signalwort: Achtung

Gefahrenhinweis(e)



H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Peroxidase Substrate (TMB)

Signalwort: Gefahr



Gefahrenhinweis(e)

H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Diluent for SA-POD

Gefahrenhinweis(e)

EUH208: Enthält 2-Chloracetamid. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme führen können. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und 2- und HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollte aber dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich gründlich die Hände, wenn eine Kontamination aufgetreten ist und bevor Sie das Labor verlassen. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfälle, einschließlich Testproben, vor der Entsorgung. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, jedoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie wie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren oder den Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.	
Pipettieren:	50 µL Calibrators, controls und Patientenserum
Pipettieren:	25 µL AQP4-Biotin (rekonstituiert) in jede Vertiefung (außer Blank)
Inkubieren:	2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Material trockenklopfen ¹
Pipettieren:	100 µL SA-POD (verdünnt 1:20) in jede Vertiefung (außer Blank)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Material trockenklopfen ^{1, 2}
Pipettieren:	100 µL TMB in jede Vertiefung (einschließlich Blank)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln ohne Schütteln
Pipettieren:	100 µL Stop Solution in jede Vertiefung (einschließlich blank) und für 5 Sekunden schütteln
Innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 450nm und bei 405nm messen ³	

¹Wenn ein automatischer Plattenwascher verwendet wird, ist es nicht erforderlich, die Platten nach dem Waschen trockenzuklopfen.

²Wenn manuell gewaschen wird, sollte beim abschließenden Waschschrift Reinstwasser verwendet werden.

³Wenn bei nur einer Wellenlänge gemessen werden kann, können 405 nm verwendet werden.