Gebrauchsinformation

EIA zur quantitativen Bestimmung von humanen anti-Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Antikörpern

REF 12000

CellTrend GmbH
Im Biotechnologiepark 3, D-14943 Luckenwalde • Tel.: +49 (0)3371 / 61 99 600 • Email: info@celltrend.de

Verwendungszweck

Der CellTrend anti-Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Antikörper-ELISA (ATR1-ELISA) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Antikörpern des Typs IgG gegen den Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 im Humanserum und -plasma. Dieser Marker spielt eine wichtige Rolle zur Differentialdiagnostik der Sklerodermie und zur Vorhersage vaskulärer Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen.

Testprinzip

Der AT1R-EIA ist ein Antikörper-Suchtest. An der Mikrotiterplatte sind Angiotensin-Rezeptoren gebunden. Während der Inkubation werden die in den Proben vorhandenen anti-Rezeptor-Antikörper an der Platte immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem anti-human-IgG-Sekundärantikörper, der mit Peroxidase markiert ist. In der folgenden enzymatischen Substratreaktion bildet sich ein farbiges Produkt, dessen Farbintensität proportional der Konzentration und/oder Avidität der anti-Angiotensin-Rezeptor-Antikörper ist.

Bestandteile der Testpackung

MTP	Mikrotiter-Module, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 beschichtet	12 x 8
BUF WASH 10x	Waschpuffer, 10fach konz. ✦	50 ml
DIL SPE	Proben-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig ✦	50 ml
DIL CON	Konjugat-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig ✦	14 ml
CAL 1-5	Standards, gebrauchsfertig [2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 U/ml]	1 ml
CONTROL +	Positivkontrolle, gebrauchsfertig	1 ml
CONTROL -	Negativkontrolle, gebrauchsfertig	1 ml
CONJ ENZ 100x	anti-human-IgG, Peroxidasekonjugat, 100fach konz.✦	0,2 ml
SUBS TMB	TMB-Substrat, gebrauchsfertig	12 ml
SOLN STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig (0,5 M Schwefelsäure)	12 ml

✦ : enthält ProClin 300

Kurzanleitung

A. Vorbereitung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Waschpuffer 1:10 verdünnen
3. Serumproben 1:100 mit Proben-Verdünnungspuffer verdünnen

B. Durchführung

1. Je 100µl verdünnte Probe, Standards, Kontrollen, Leerwert/Well pipettieren
2. 2 h bei 2-8 °C inkubieren
3. 3x mit je 300µl/Well Waschpuffer waschen
4. Peroxidasekonjugat frisch 1:100 mit Konjugat-Verdünnungspuffer verdünnen
5. Je 100µl/Well Peroxidasekonjugat pipettieren
6. 1h bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren
7. 3x mit je 300µl/Well Waschpuffer waschen
8. 100µl/Well Substratlösung pipettieren
9. 20min bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubieren
10. 100µl/Well Stopplösung zugeben
11. Absorption bei 450nm messen

Wichtige Hinweise

- Testkit bei 2-8 °C lagern.
- Nur zur in-vitro Bestimmung.
- Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr benutzen. Das Verfalldatum ist auf der Verpackung angegeben.
- Vor Gebrauch diese Gebrauchsinformation sorgfältig durchlesen.
- Die Testdurchführung muss durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.
- Lipämische, ikterische, hämolytische oder bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.
- Die Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, daher Berührung mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Die Standard- und Kontrollmaterialien dieses Tests wurden aus menschlichen Seren hergestellt, die auf Hepatitis B-Oberflächen Antigen (HB_sAg), Anti-HCV- und Anti-HIV1/2-Antikörper getestet wurden und negativ waren.
- Trotzdem sollten alle Reagenzien und Proben als potentiell infektiös angesehen werden. Die Vorsichtsmaßnahmen zum Umgang mit infektiösem Material sind unbedingt einzuhalten.
- Die Stopplösung SOLN | STOP enthält Schwefelsäure. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

Zusätzlich erforderliche Chemikalien und Geräte

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Messzylinder
- Mikropipetten (Mehrkanalpipette, Multipipette)
- Wirbelmischer (Vortex)
- Schüttler für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450nm Wellenlänge

Probenmaterial und -lagerung

Raumtemperatur: bis zu 48h
Kühlschrank (2-8°C): bis zu 4 Tage
Gefrierschrank (≤ -20°C) bis zu 12 Monate
Wiederholtes Einfrieren/Auftauen vermeiden!
Neben Serum eignet sich auch Plasma (EDTA, Citrat oder Heparin) zur Bestimmung der anti-Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Antikörper.

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

- Vor Testbeginn alle Komponenten auf Raumtemperatur bringen, evtl. auskristallisierte Salze der Pufferkonzentrate in Lösung bringen.
- Die Kavitäten der Mikrotiter-Module MTP können durch Abbrechen genau dem Bedarf angepasst werden. Nicht benutzte Module sind zusammen mit dem Trockenbeutel in der wiederverschließbaren Originalverpackung stets gut verschlossen bei 2-8 °C zu lagern.
- Das Waschpuffer-Konzentrat BUF | WASH 10x ist vor Gebrauch mit destilliertem Wasser **1:10** zu verdünnen (z. B. 50ml + 450ml Wasser). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens 30 Tage haltbar.
- Die humanen Serumproben sind **1:100** mit Proben-Verdünnungspuffer DIL | SPE zu verdünnen. (z. B. 5µl Serum + 495µl Puffer).
- Das Peroxidasekonjugat-Konzentrat CONJ ENZ | 100x ist vor Gebrauch mit Konjugat-Verdünnungspuffer DIL | CONJ **1:100** zu verdünnen (z. B. 50µl + 4950µl Puffer). Die Konjugatlösung ist stets frisch anzusetzen.
- Die Standards CAL | 1-5, die Positivkontrolle CONTROL | +, die Negativkontrolle CONTROL | -, der Proben-Verdünnungspuffer DIL | SPE und der Konjugat-Verdünnungspuffer DIL | CONJ sind gebrauchsfertig. Nach Anbruch sind sie bis zum Verfalldatum des Testkits haltbar.

Testdurchführung

1. Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen durchzuführen.
2. Eine ausreichende Anzahl Mikrotiter-Module zum Ansatz von Standards, Kontrollen und Proben vorbereiten.
3. Je 100µl der Serumverdünnungen, der Standardreihe, der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und des Verdünnungspuffers (Leerwert) in die jeweiligen Wells pipettieren.
4. 2 Stunden bei 2-8 °C (Kühlschrank) inkubieren, die Wells dabei mit der Klebefolie abdecken.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen entleeren und 3x mit je 300µl/Well Waschpuffer waschen, Pufferreste durch Ausschlagen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
6. 100µl der Peroxidasekonjugatlösung in jede Kavität pipettieren.
7. 1 Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt (Folie) auf dem Schüttler inkubieren.
8. Waschen wie bei 5. beschrieben.
9. Jeweils 100µl TMB-Substratlösung SUBS | TMB in die Kavitäten pipettieren.
10. Die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
11. 100µl Stopplösung SOLN | STOP in jedes Well geben.
12. Messung der optischen Dichte im Photometer bei 450nm (möglichst Messung mit einer Referenzwellenlänge von 620-690nm). Die Färbung der Lösung ist mindestens 30 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

Auswertung

Zur Auswertung dieses Tests ist eine Computer-ELISA-Software zur Kurvenanpassung der Standardpunkte hilfreich. Eine lineare Auftragung der Konzentrationen der Standards (2,5U/ml, 5U/ml, 10U/ml, 20U/ml, 40U/ml) auf der x-Achse, die lineare Auftragung der Absorption (y-Achse) und eine 4-Parameter-Kurvenanpassung wird empfohlen.

Der Test ist auswertbar, wenn die Positivkontrolle im angegebenen Bereich (siehe Flaschenetikett) und die Negativkontrolle unter dem cut off-Wert (10 U/ml) liegen. Die Eichpunkte müssen stetig ansteigen.

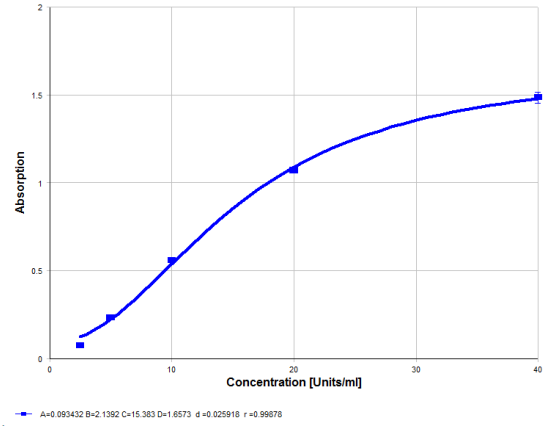
Der ATR1-Antikörper-Gehalt der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Proben >17 U/ml sind positiv, Proben 10-17 U/ml sind als erhöhtes Risiko zu bewerten (at risk), Proben <10 U/ml sind negativ.

Liegen Messwerte oberhalb der Standardkurve, kann in einer nachfolgenden Bestimmung mit einer höheren Probenverdünnung (z.B. 1:500) ein geeigneter Messwert erzielt werden. Das Resultat in U/ml muss dann mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor (z.B. 5) multipliziert werden.

Eine Therapieentscheidung sollte niemals nur auf einem Testergebnis beruhen. Das Ergebnis ist mit anderen klinischen Beobachtungen und diagnostischen Ergebnissen zusammen zu bewerten. Jede Einrichtung sollte seine eigenen Normwerte ermitteln.

Testcharakteristik

Typische Standardkurve



Intraassay-Variationskoeffizient
(n=10)
Probe 1 (21,4 U/ml): 3.9%

Interassay-Variationskoeffizient
(n=20)
Probe 1 (22,9 U/ml): 5.1%

Diese Standardkurve ist nur zu Demonstrationszwecken abgebildet und darf nicht zur Auswertung verwendet werden.

Symbols / Symbole / Symbôles / Simbolos / Simbolos / Simboli / Συμβολα

REF	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.º Cat.: / N.–Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
LOT	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lote N.º: / Lotto n.: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Usar até: / Da utilizzare entro: / Χρησιμοποιείται από:
Σ	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / N.º de Testes: / Quantità dei tests: / Αριθμός εξετάσεων:
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device. / In-vitro-Diagnostikum. / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro. / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro. / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro. / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro. / Ιατρική συσκευή για In-Vitro .ιάγνωση.
	Read instructions before use. / Arbeitsanleitung lesen. / Lire la fiche technique avant emploi. / Lea las instrucciones antes de usar. / Ler as instruções antes de usar. / Leggere le istruzioni prima dell'uso. / .ιαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση.
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazenar a: / Conservare a: / Αποθήκευση στους:
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabbricante: / Παραγωγός: