

AESKULISA U1-70

REF 7104US

Instruction manual

Contents

1. Intended Use.....	2
2. Clinical Applications and Principle of the Assay.....	2
3. Kit Contents.....	3
4. Storage and Shelf Life.....	3
5. Precautions of Use.....	4
6. Sample Collection, Handling and Storage.....	4
7. Assay Procedure.....	5
8. Semi-Quantitative and Qualitative Interpretation.....	6
9. Technical Data.....	7
10. Performance Data.....	7-8
11. Literature.....	8
A : Pipetting scheme.....	9
B : Test Protocol.....	19

1. Intended Use

AESKULISA U1-70 is a solid phase enzyme immunoassay employing recombinant human 70 kDa protein of the U1-snRNP complex for the semi-quantitative and qualitative detection of antibodies against the 70 kDa U1-RNP in human serum. The assay is an aid in the diagnosis of mixed connective tissue diseases (MCTD) and systemic lupus erythematosus (SLE) and should be used in conjunction with other serological tests and clinical findings.

2. Clinical Application and Principle of the Assay

The U1-snRNP complex is a small nuclear ribonucleoprotein particle composed of uridine rich (thus U) small nuclear RNA and a set of proteins: the 70 kDa U1-specific ribonucleoprotein plus proteins A and C (all formerly summarized as RNPs) and the Sm (Smith) antigen which comprises eight proteins: B, B', D1, D2, D3, E, F, and G. Because of its protein components, the Sm and RNPs, the complex is often named RNP/Sm complex. The U1-snRNP complex is a part of the splicosomal complex, that facilitates the processing of pre-mRNA to mature mRNA in the nucleus.

Antibodies against the 70 kDa protein of the U1-snRNP complex belong to the heterogenous group of anti-nuclear antibodies (ANA), which are associated with various autoimmune diseases. They are directed against various proteins of the nucleus. Indirect immunofluorescence test (IFT) on eucaryotic cells like HeLa has been the established method for the detection of ANAs. Single antibody specificities are distinguished by fluorescence patterns but more specific testing by ELISAs employing the target antigens are available too for a simple and reliable differentiation of ANAs.

Antibodies against the 70 kDa U1-specific protein are found in 95% of mixed connective tissue diseases (MCTD) but do also occur in systemic lupus erythematosus (SLE) with a prevalence of 40%. Isolated occurrence of anti-70 kDa antibodies is typical for the Sharp syndrome. Whilst antibodies against Sm are highly specific for systemic lupus erythematosus (SLE) and thus are included in diagnostic and classification criteria for SLE. Anti-Sm antibodies are found in 20-30% of patients with SLE.

Principle of the test

Serum samples diluted 1:101 are incubated in the microplates coated with the specific antigen. Patient's antibodies, if present in the specimen, bind to the antigen. The unbound fraction is washed off in the following step. Afterwards anti-human immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (conjugate) are incubated and react with the antigen-antibody complex of the samples in the microplates. Unbound conjugate is washed off in the following step. Addition of TMB-substrate generates an enzymatic colorimetric (blue) reaction, which is stopped by diluted acid (color changes to yellow). The rate of color formation from the chromogen is a function of the amount of conjugate bound to the antigen-antibody complex and this is proportional to the initial concentration of the respective antibodies in the patient sample.

3. Kit Contents

To be reconstituted:

5x Sample Buffer 1 vial, 20 ml - 5x concentrated (capped white: yellow solution)
Containing: Tris, NaCl, BSA, sodium azide (preservative)

50x Wash Buffer 1 vial, 20 ml - 50x concentrated (capped white: green solution)
Containing: Tris, NaCl, Tween, sodium azide (preservative)

Ready to use:

Negative Control 1 vial, 1.5 ml (capped green: yellow solution)
Containing: Human serum (diluted), sodium azide (preservative)

Positive Control 1 vial, 1.5 ml (capped red: yellow solution)
Containing: Human serum (diluted), sodium azide (preservative)

Cut-off Control 1 vial, 1.5 ml (capped blue: yellow solution)
Containing: Human serum (diluted), Sodium Azide (preservative)

Calibrators 6 vials, 1.5 ml each 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml
(color increasing with concentration: yellow solutions)
Containing: Human serum (diluted), sodium azide (preservative)

Conjugate 1 vial, 15 ml IgG (capped blue: blue solution)
Containing: Anti-human immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase

TMB Substrate 1 vial, 15 ml (capped black)
Containing: Stabilized TMB/H₂O₂

Stop Solution 1 vial, 15 ml (capped white: colorless solution)
Containing: 1M Hydrochloric Acid

Microtiterplate 12x8 well strips with breakaway microwells
Coating see paragraph 1

Material required but not provided:

Microtiter plate reader 450 nm reading filter and optional 620 nm reference filter (600-690 nm). Glass ware, test tubes for dilutions. Vortex mixer, precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000 µl) or multi-pipette. Microplate washing device (multichannel pipette or automated system), adsorbent paper. Our tests are designed to be used with purified water according to the definition of the United States Pharmacopeia (USP 26 - NF 21) and the European Pharmacopeia (Eur.Ph. 4th ed.).

4. Storage and Shelf Life

Store all reagents and the microplate at 2-8°C/35-46°F, in their original containers. Once prepared, reconstituted solutions are stable for 1 month at 4°C/39°F, at least. ***Reagents and the microplate shall be used within the expiry date indicated on each component, only. Avoid intense exposure of TMB solution to light. Store microplates in designated foil, including the desiccant, and seal tightly.***

5. Precautions of Use

5.1 Health hazard data

THIS PRODUCT IS FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY. Thus, only staff trained and specially advised in methods of in vitro diagnostics may perform the kit. Although this product is not considered particularly toxic or dangerous in conditions of normal use, refer to the following for maximum safety :

Recommendations and precautions

This kit contains potentially hazardous components. Though kit reagents are not classified being irritant to eyes and skin we recommend to avoid contact with eyes and skin and wear disposable gloves.

Do not smoke, eat or drink when manipulating the kit.

Do not pipette by mouth.

All human source material used for some reagents of this kit (controls, standards e.g.) has been tested by approved methods and found negative for HbsAg, Hepatitis C and HIV 1. However, no test can guarantee the absence of viral agents in such material completely. Thus handle kit controls, standards and patient samples as if capable of transmitting infectious diseases and according to national requirements.

5.2 General directions for use

Do not mix or substitute reagents or microplates from different lot numbers. This may lead to variations in the results.

Allow all components to reach room temperature (20-26°C/64-78.8°F) before use, mix well and follow the recommended incubation scheme for an optimum performance of the test.

Never expose components to higher temperature than 37°C/ 98,6 °F.

Always pipette substrate solution with brand new tips only. Protect this reagent from light. Never pipette conjugate with tips used with other reagents prior.

A definite clinical diagnosis should not be based on the results of the performed test only, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated. The diagnosis is to be verified using different diagnostic and medicinal methods if the patient has got infectious diseases accompanied by medication.

6. Sample Collection, Handling and Storage

Use preferentially freshly collected serum samples. Blood withdrawal must follow national requirements.

Do not use icteric, lipemic, hemolysed or bacterially contaminated samples. Sera with particles should be cleared by low speed centrifugation (<1000 x g). Blood samples should be collected in clean, dry and empty tubes. After separation, the serum samples should be used immediately, respectively stored tightly closed at 2-8°C/35-46°F up to three days, or frozen at -20°C/-4°F for longer periods.

7. Assay Procedure

7.1 Preparations prior to pipetting

Dilute concentrated reagents:

Dilute the concentrated sample buffer 1:5 with distilled water (e.g. 20 ml plus 80 ml).

Dilute the concentrated wash buffer 1:50 with distilled water (e.g. 20 ml plus 980 ml).

Samples

Dilute serum samples 1:101 with sample buffer (1x)

e.g. 1000 µl sample buffer (1x) + 10 µl serum. Mix well !

Washing

Prepare 20 ml of diluted wash buffer (1x) per 8 wells or 200 ml for 96 wells.

e.g. 4 ml concentrate plus 196 ml distilled water.

Automated washing:

Consider excess volumes required for setting up the instrument and dead volume of robot pipette.

Manual washing:

Discard liquid from wells by inverting the plate. Knock the microwell frame with wells downside vigorously on clean adsorbent paper. Pipette 300 µl of diluted wash buffer into each well, wait for 20 seconds. Repeat the whole procedure twice again.

Microplates

Calculate the number of wells required for the test. Remove unused wells from the frame, replace and store in the provided plastic bag, together with desiccant, seal tightly (2-8°C/35-46°F).

7.2 Work flow

- Pipette 100 µl of each patient's diluted serum into the designated microwells.
- Pipette 100 µl calibrators OR cut-off control and negative and positive controls into the designated wells.
- Incubate for 30 minutes at room temperature (20-26°C/64-78.8°F).
- Wash 3x with 300 µl washing buffer (diluted 1:50).
- Pipette 100 µl conjugate into each well.
- Incubate for 15 minutes at room temperature (20-26°C/64-78.8°F).
- Wash 3x with 300 µl washing buffer (diluted 1:50).
- Pipette 100 µl TMB substrate into each well.
- Incubate for 15 minutes at room temperature (20-26°C/64-78.8°F), in the dark.
- Pipette 100 µl stop solution into each well, using the same order as pipetting the substrate.
- Incubate 5 minutes minimum.
- Agitate plate carefully for 5 sec.
- Read absorbance at 450 nm (optionally 450/620 nm) within 30 minutes.

8. Quantitative and Qualitative Interpretation

For **quantitative interpretation** establish the standard curve by plotting the **optical density (OD)** of **each calibrator (y-axis)** with respect to the corresponding concentration values in **U/ml (x-axis)**. For best results we recommend log/lin coordinats and 4-Parameter Fit. From the OD of each sample, read the corresponding antibody concentrations expressed in **U/ml**.

Normal Range	Positive Results
≤ 15 U/ml	> 15 U/ml

Example of a standard curve

We recommend pipetting calibrators in parallel for each run.

Calibrators IgG	OD 450/620 nm	CV %
0 U/ml	0.044	3.2
3 U/ml	0.132	0.6
10 U/ml	0.300	2.1
30 U/ml	0.557	2.8
100 U/ml	1.224	1.9
300 U/ml	2.130	0.3

Example of calculation

Patient	Replicate (OD)	Mean (OD)	Result (U/ml)
P 01	1.156/1.108	1.132	86.9
P 02	0.543/0.564	0.554	29.9

For lot specific data, see enclosed quality control leaflet. Medical laboratories might perform an in-house Quality Control by using own controls and/or internal pooled sera, as foreseen by EU regulations. **Do not use this example for interpreting patients results!**

Each laboratory should establish its own normal range based upon its own techniques, controls, equipment and patient population according to their own established procedures.

For **qualitative interpretation** read the optical density of the cut-off control and the patient samples. Compare patient's OD with the OD of the cut-off control. All samples which are higher than cut-off are considered positive.

Negative:	OD patient < OD cut-off
Positive:	OD patient > OD cut-off

9. Technical Data

Sample material:	serum
Sample volume:	10 µl of sample diluted 1:101 with 1x sample buffer
Total incubation time:	60 minutes at room temperature (20-26°C/64-78.8°F)
Calibration range:	0-300 U/ml
Analytical sensitivity:	1.0 U/ml
Storage:	at 2-8°C/35-46°F use original vials, only
Number of determinations:	96 tests

10. Performance Data

10.1 Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of this kit has been found at 1.0 U/ml.

10.2 Specificity and sensitivity

The microplate is coated with **recombinant human 70kDa U1-snRNP**.

No crossreactivities to other autoantigens have been found. Antibodies against 70kDa protein of the U1 snRNP complex occur in different diseases which are shown in the table below:

Disease	prevalence
MCTD	95%
SLE	40%

A study with 20 Anti-U1-70 positive and 53 negative sera (from patients with various rheumatic disorders) and the AESKULISA U1-70 is shown in the table below.

clinical data for U1-70	results from the AESKULISA U1-70		
		positive	negative
	positive	20	0
	negative	0	53

100% agreement

10.3 Linearity

Chosen sera have been tested with this kit and found to dilute linearly. However, due to the heterogeneous nature of human autoantibodies there might be samples that do not follow this rule.

Sample No.	Dilution measured Factor	expected concentration (U/ml)	Recovery concentration (U/ml)	(%)
1	1 / 100	144.0	148.0	97.3
	1 / 200	73.5	74.0	99.3
	1 / 400	36.5	37.0	98.6
	1 / 800	18.0	18.5	97.3
2	1 / 100	54.3	55.0	98.7
	1 / 200	26.4	27.5	96.0
	1 / 400	12.9	13.8	93.5
	1 / 800	6.5	6.9	94.2

10.4 Precision

To determine the precision of the assay, the variability (intra and inter-assay) was assessed by examining its reproducibility on three serum samples selected to represent a range over the standard curve.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)	Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	151.0	2.3	1	148.0	2,6
2	72.0	3.6	2	70.0	4,1
3	26.0	4.5	3	24.0	3,9

10.5 Calibration

The Aeskulisa U1-70 is calibrated against reference sera from the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Atlanta. The results are expressed in U/ml.

11. Literature

- Peter JB, Shoenfeld Y (1996).**
Autoantibodies.
Elsevier Sciences B.V., Amsterdam
- Hackl W, Fischer U, Luhrmann R (1994).**
A 69 kD protein that associates reversibly with the Sm core domain of several splicosomal snRNP species.
J Cell Biol 124: 261-272.
- Guldner HH (1992).**
Mapping of epitopes recognized by anti-(U1)RNP antibodies.
Mol Biol Rep 16: 155-164.
- Klein Gunnewiek JMT, Van de Putte LBA, van Venrooij WJ (1997).**
The U1 snRNP complex: An autoantigen in connective tissue diseases: An update.
Clin Exp Rheumatol 15: 549-560.
- Von Mühlen CA, Tan EM (1995).**
Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases.
Semin Arthritis Rheum 24: 323-358.

A: Pipetting Scheme

		Calibrators (A-F)	Controls	Samples
Pipette Pipette Pipette	Calibrators (A-F) 100 µl each Controls 100 µl each Prediluted samples (1:101) 100 µl each			
Incubate	30 min at room temperature (20-26°C/64-78.8°F)			
Decant	Wash 3x with 300 µl of wash buffer (1x)			
Pipette	Conjugate	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate	15 min at room temperature (20-26°C/64-78.8°F)			
Decant	Wash 3x with 300 µl of wash buffer (1x)			
Pipette	Substrate	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate	15 min at room temperature (20-26°C/64-78.8°F), in the dark.			
Pipette	Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate	5 min at room temperature (20-26°C/64-78.8°F)			
Agitate plate for 5 seconds and read OD at λ450 nm (optionally λ450/620 nm) within 30 minutes. Resulting color is stable for 30 minutes, at least.				

Gebrauchsanweisung

Inhaltsverzeichnis

1. Zweckbestimmung.....	11
2. Klinische Anwendung und Testprinzip.....	11
3. Kit Bestandteile.....	12
4. Lagerung und Haltbarkeit.....	12
5. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	13
6. Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung.....	13
7. Testdurchführung.....	14
8. Quantitative und qualitative Auswertung.....	15
9. Technische Daten.....	16
10. Testdaten/ Testcharakteristik.....	16-17
11. Literatur.....	17
A : Pipettierschema (deutsch).....	18
B : Testprotokoll (deutsch/engl.).....	19

1. Zweckbestimmung

AESKULISA U1-70 ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay mit dem rekombinanten humanen 70 kDa Protein des U1-snRNP-Komplexes zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Antikörpern gegen das 70 kDa Protein des U1-RNP in humanem Serum. Der Test dient der Diagnostik von Mischkollagenosen (mixed connective tissue diseases, MCTD) und dem Systemischen Lupus erythematoses (SLE).

2. Klinische Anwendung und Testprinzip

Der U1-snRNP-Komplex ist ein kleiner nukleärer Ribonukleoprotein-Partikel (small nuclear ribonucleoprotein particle, snRNP) und besteht aus Uridin-reicher (daher U) kleiner nukleärer RNA und Proteinen, zu denen neben dem Sm (Smith) Antigen die Ribonukleoproteine (RNPs) A und C sowie ein 70 kDa Protein gehört, welches spezifisch nur im U1-snRNP-Komplex vorkommt. Das Sm-Antigen setzt sich aus acht Proteinen zusammen: B/B', D1, D2, D3, E, F und G.

Nach seinen Komponenten Sm und RNPs wird der Komplex auch oft als RNP/Sm bezeichnet.

U1-snRNP ist ein Bestandteil von Spleißosomen, die an der Prozessierung von pre-mRNA zu reifer RNA im Zellkern beteiligt sind.

Antikörper gegen das 70 kDa Protein des U1-snRNP Komplexes gehören zu der heterogenen Gruppe der anti-nukleären Antikörper (ANAs), die bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen auftreten. Sie sind gegen diverse Proteine des Zellkerns gerichtet. Der ANA-Nachweis erfolgte ursprünglich durch einen indirekten Immunfluoreszenz-Test (IFT) an eukaryotischen Zellen wie z.B. HeLa-Zellen. Aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzmuster kann die Spezifität der einzelnen ANAs unterschieden werden, der Nachweis der Autoantikörper im ELISA mit entsprechenden spezifischen Antigenen erlaubt jedoch eine einfachere und zuverlässigere Differenzierung der ANAs nach ihrer Spezifität.

Antikörper gegen das 70 kDa U1-spezifische Protein werden bei Mischkollagenosen (mixed connective tissue diseases, MCTD) mit einer Häufigkeit von 95% gefunden, sie treten aber auch mit einer Prävalenz von 40% beim systemic Lupus erythematosus (SLE) auf. Ein isoliertes Auftreten von anti-70kDa-Antikörpern ist typisch für das Sharp-Syndrom. Dagegen sind Antikörper gegen Sm hochspezifisch für den SLE und stellen daher eines der Kriterien für die Diagnose des SLE dar. Anti-Sm Antikörper treten bei 20-30% der Patienten mit SLE auf.

Testprinzip

Die 1:101 verdünnten Serumproben werden in den Kavitäten, welche mit dem spezifischen Antigen beschichtet sind, inkubiert. Hierbei binden spezifische Antikörper aus dem Patientenserum, wenn vorhanden, an das Antigen auf der Platte; ungebundene Serumkomponenten werden im folgenden Waschschrift gewaschen. Anschließend werden anti-Human Immunoglobuline, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind (Konjugat), zugegeben. Während einer Inkubation binden diese an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex, nicht gebundene Immunglobuline werden im folgenden Waschschrift entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion (blau) des Substrates, die mit verdünnter Säure abgestoppt wird (Farbumschlag nach gelb). Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an den Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Konjugatmenge und somit direkt proportional zur Antikörperkonzentration im Serum.

3. KIT Bestandteile

Vor Gebrauch verdünnen:

Probenpuffer 5x	1 Flasche, 20 ml - 5 fach konzentriert (weißer Verschluss: gelb eingefärbt) Bestandteile: Tris NaCl, BSA, Natriumazid (Konservierungsstoff)
Waschpuffer 50x	1 Flasche, 20 ml - 50 fach konzentriert (weißer Verschluss: grün eingefärbt) Bestandteile: Tris, NaCl, Tween, Natriumazid (Konservierungsstoff)

Gebrauchsfertig:

Negativ Kontrolle	1 Flasche, 1.5 ml (grüner Verschluss: gelb eingefärbt) Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid (Konservierungsstoff)
Positiv Kontrolle	1 Flasche, 1.5 ml (roter Verschluss: gelb eingefärbt) Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid (Konservierungsstoff)
Cut-off Kontrolle	1 Flasche, 1.5 ml (blauer Verschluss: gelb eingefärbt) Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid (Konservierungsstoff)
Kalibratoren	6 Flaschen, je 1.5 ml mit 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml (Farbintensität mit Konzentration steigend: gelb eingefärbt) Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid (Konservierungsstoff)
Konjugat	1 Flasche, 15 ml IgG (blauer Verschluss: blau eingefärbt) Bestandteil: Anti-human Immunoglobulin markiert mit Meerrettichperoxidase
TMB Substrat	1 Flasche, 15 ml (schwarzer Verschluss) Bestandteil: Stabilisiertes TMB/H ₂ O ₂
Stopp-Lösung	1 Flasche, 15 ml (weißer Verschluss: farblose Lösung) Bestandteil: 1M Salzsäure
Mikrowell-Streifen	12 x 8 Kavitäten, brechbar. Beschichtung siehe Punkt 1

Erforderliche Materialien:

Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 620 nm (600-690 nm). Glaswaren, Gefäße für Verdünnungen, Wirbelmischer, Mikropipetten 10, 100, 200, 500, 1000 µl, Multipipette. Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehr-kanalpipette und Filterpapier.

Unsere Tests wurden für die Verwendung mit gereinigtem Wasser (purified water) nach der Definition der U.S. Pharmakopöe (USP 26 - NF 21) und der Europäischen Pharmakopöe entwickelt (Eur.Ph. 4te Ed.).

4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Lagerung der Kitreagenzien und der Mikrotiterplatte soll bei 2-8°C/35-46°F in den Originalflaschen erfolgen. Verdünnte Lösungen sind bei 4°C/39°F einen Monat haltbar. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.

Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen! Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung TMB ist zu vermeiden. Mikrotiterplatten stets in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel verschlossen aufbewahren.

5. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

5.1 Gesundheitsrisiko

DIESES PRODUKT DARF AUSSCHLIESSLICH ZUR *IN VITRO DIAGNOSTIK* VERWENDET WERDEN.

Die Anwendung muss durch Personal erfolgen, das speziell in der Verwendung von in vitro-Diagnostika unterrichtet und ausgebildet wurde. Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien sind bei vorschriftmäßigem Gebrauch weder als toxisch noch als gesundheitsgefährlich einzustufen, dennoch sollte zur Gewährleistung der maximalen Sicherheit des Anwenders folgendes eingehalten werden:

Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen

Da einzelne Komponenten des Kits potentiell gefährdende Reagenzien enthalten, können diese eine Reizung der Augen und der Haut hervorrufen.

Während des Arbeitens mit dem Kit nicht essen, trinken oder rauchen.

Nicht mit dem Mund pipettieren, Einmal-Handschuhe tragen.

Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs (Kontrollen und Kalibratoren) erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg), Hepatitis C und HIV 1 und 2 als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierte Krankheitserreger enthalten sind. Daher sind Kontrollen, Kalibratoren sowie Patientenseren als potentiell infektiös einzustufen und entsprechend der nationalen Rechtslage zu handhaben.

5.2 Allgemeine Hinweise

Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden, da dies zu Verfälschungen der Messergebnisse führen kann.

Alle Kit-Komponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20-26°C/64-78,8°F) bringen und gut durchmischen. Das vorgeschriebene Protokoll zur Durchführung des Tests ist unbedingt einzuhalten.

Setzen Sie die einzelnen Kit-Komponenten niemals höheren Temperaturen als 37 °C/ 98,6°F aus.

De Substrat-Lösung immer mit verkaufsneuen Pipettenspitzen pipettieren, um Kontaminationen zu vermeiden. Intensiven Lichtkontakt der Substratlösung vermeiden. Konjugat-Lösung niemals mit Pipettenspitzen pipettieren, welche mit anderen Reagenzien kontaminiert sind.

Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht alleine auf den Ergebnissen des durchgeführten Tests erfolgen, sondern vom Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde erstellt werden.

6. Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung

Die Verwendung frischer Serumproben wird empfohlen. Die Blutentnahme hat nach der nationalen Rechtslage zu erfolgen.

Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Serumproben nicht verwenden. Bei trüben Proben die Partikel niedrig abzentrifugieren (<1000 x g).

Blutproben in saubere, trockene und leere Röhrchen aufnehmen. Nach der Gewinnung sollte das Serum direkt verwendet werden. Serumproben können bei 2-8°C/35-46°F zwei bis drei Tage aufbewahrt werden, ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben bei -20°C tiefgefroren werden.

7. Testdurchführung

7.1 Vorbereitung

Verdünnung konzentrierter Reagenzien:

Konzentrierten Probenpuffer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20 ml plus 80 ml).

Konzentrierten Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20 ml plus 980 ml).

Verdünnung der Patientenproben:

Serumproben 1:101 mit verdünntem Probenpuffer (1x) verdünnen und mischen,
z.B. 1000 µl Probenpuffer + 10 µl Serum.

Waschen

Es werden 20 ml verdünnten Waschpuffers (1x) pro 8 Kavitäten oder 200 ml pro 96 Kavitäten benötigt
z.B. 4 ml Konzentrat plus 196 ml destilliertes Wasser.

Automatisiertes Waschen:

Für die Inbetriebnahme des Instrumentes und das Totvolumen sind zusätzliche Waschpuffermengen zu berücksichtigen.

Manuelles Waschen:

Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf Filterpapier entfernen. 300 µl verdünnten Waschpuffer in jede Kavität pipettieren, 20 Sekunden warten. Den Vorgang noch zweimal wiederholen.

Mikrotiterplatte

Unbenutzte Kavitäten entfernen und fest verschlossen in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel kühl lagern (2-8°C/35-46°F).

7.2 Arbeitsschritte

- Je 100 µl der verdünnten Seren in die vorgesehenen Kavitäten pipettieren.
- Je 100 µl der Kalibratoren beziehungsweise der Cut-off Kontrolle und der negativ und positiv Kontrolle in die Kavitäten pipettieren.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F) inkubieren.
- 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.
- 100 µl Enzymkonjugatlösung in jede Kavität geben.
- 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F) inkubieren.
- 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.
- 100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
- 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F) im Dunkeln inkubieren.
- 100 µl Stopplösung pro Kavität in der Reihenfolge der Substratzugabe pipettieren.
- Mindestens 5 Minuten inkubieren.
- Platte vorsichtig 5 Sekunden schütteln.
- Optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten messen (empfehlenswert bei 450/620 nm).

8. Quantitative und qualitative Auswertung

Die **quantitative Auswertung** erfolgt anhand einer Standardkurve, bei der die **optische Dichte der Kalibratoren (y-Achse)** gegen die Konzentration in **U/ml (x-Achse)** aufgetragen wird. Eine log/lin Auftragung und ein 4-Parameter-Fit wird zur Auswertung empfohlen. Anhand der Kurve wird aus der optischen Dichte der Probe die Antikörper-Konzentration in **U/ml** ermittelt.

Normalbereich	Positive Ergebnisse
≤ 15 U/ml	> 15 U/ml

Auswertungsbeispiel

Die Erstellung einer Standardkurve wird für jeden Testansatz empfohlen.

Kalibratoren IgG	OD 450/620 nm	CV %
0 U/ml	0,044	3,2
3 U/ml	0,132	0,6
10 U/ml	0,300	2,1
30 U/ml	0,557	2,8
100 U/ml	1,224	1,9
300 U/ml	2,130	0,3

Kalkulationsbeispiel

Patient	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Ergebnis (U/ml)
P 01	1,156/1,108	1,132	86,9
P 02	0,543/0,564	0,554	29,9

Chargen spezifische Daten entnehmen Sie bitte dem beiliegenden Kontrollzertifikat. Medizinische Laboratorien sollten In-house Qualitätskontrollen mit eigenen Kontrollen und/oder Poolseren nach EU Reglement durchführen. **Dieses Beispiel darf nicht zur Interpretation der Patientenresultate benutzt werden !**

Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Die **qualitative Auswertung** erfolgt anhand des Vergleichs der optischen Dichte der Patientenprobe mit der optischen Dichte der Cut-off Kontrolle. Ist die optische Dichte der Patientenprobe höher als die der Cut-off Kontrolle, so ist diese als positiv zu bewerten, ist diese niedriger, so ist sie negativ.

Negativ:	OD Patient $<$ OD cut-off
Positiv:	OD Patient $>$ OD cut-off

9. Technische Daten

Probenmaterial:	Serum
Probenvolumen:	10 µl Serum für 1:101 Verdünnung mit 1x Probenpuffer
Gesamt-Inkubationszeit:	60 Minuten bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F)
Messbereich:	0-300 U/ml
Analytische Sensitivität:	1,0 U/ml
Lagerung:	bei 2-8 °C in Originalflaschen
Zahl der Bestimmungen:	96 Tests

10. Testdaten/Testcharakteristik

10.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des vorliegenden Kits wurde mit 1,0 U/ml ermittelt.

10.2 Spezifität und Sensitivität

Die Mikrotiterplatte ist mit rekombinantem **humanem** 70kDa U1-RNP Protein beschichtet. Kreuzreaktivitäten mit anderen Antigenen konnten nicht nachgewiesen werden. Antikörper gegen das 70kDa Protein des U1 snRNP-Komplexes treten bei mehreren Erkrankungen auf. Dies ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Erkrankung	Prävalenz
MCTD	95%
SLE	40%

10.3 Linearität

Für ausgewählte Seren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und Antikörperkonzentration in diesem Test ermittelt werden. Aufgrund der Heterogenität humaner Antikörper ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Seren ein nichtlineares Verhalten zeigen.

Proben Nr.	Verdünnung	gemessene Konzentration (U/ml)	erwartete Konzentration (U/ml)	Wiederfindung (%)
1	1 / 100	144,0	148,0	97,3
	1 / 200	73,5	74,0	99,3
	1 / 400	36,5	37,0	98,6
	1 / 800	18,0	18,5	97,3
2	1 / 100	54,3	55,0	98,7
	1 / 200	26,4	27,5	96,0
	1 / 400	12,9	13,8	93,5
	1 / 800	6,5	6,9	94,2

10.4 Präzision

Zur Kontrolle der Assaypräzision wurde mit drei Seren in verschiedenen Bereichen der Standardkurve die Intra- und Interassay-Varianz ermittelt.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert (U/ml)	CV (%)	Proben Nr.	Mittelwert (U/ml)	CV (%)
1	151,0	2,3	1	148,0	2,6
2	72,0	3,6	2	70,0	4,1
3	26,0	4,5	3	24,0	3,9

10.5 Kalibration

AESKULISA U1-70 ist gegen ein Referenzserum der CDC Atlanta (Centers for Disease Control and Prevention) kalibriert. Die Ergebnisse werden in U/ml angegeben.

11. Literatur

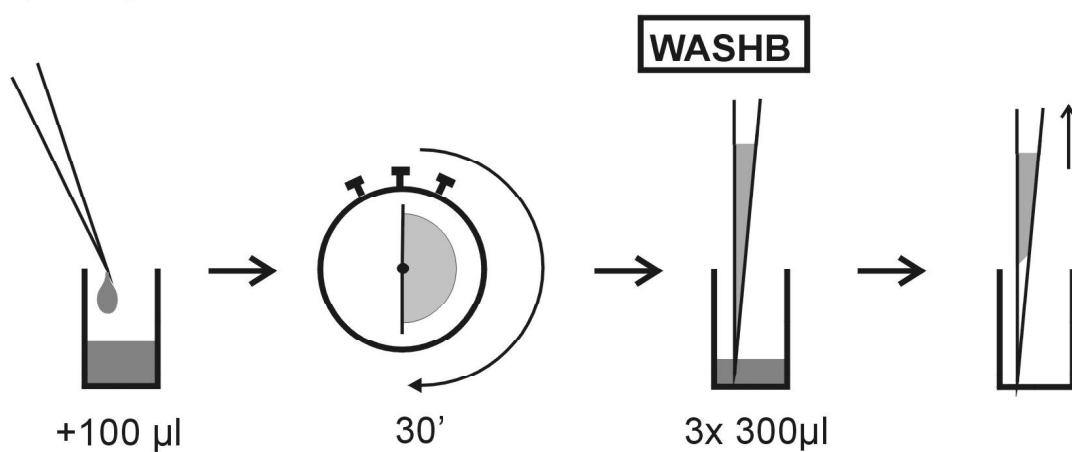
- Peter JB, Shoenfeld Y (1996).**
Autoantibodies.
Elsevier Sciences B.V., Amsterdam
- Hackl W, Fischer U, Luhrmann R (1994).**
A 69 kD protein that associates reversibly with the Sm core domain of several splicosomal snRNP species.
J Cell Biol 124: 261-272.
- Guldner HH (1992).**
Mapping of epitopes recognized by anti-(U1)RNP antibodies.
Mol Biol Rep 16: 155-164.
- Klein Gunnewiek JMT, Van de Putte LBA, van Venrooij WJ (1997).**
The U1 snRNP complex: An autoantigen in connective tissue diseases: An update.
Clin Exp Rheumatol 15: 549-560.
- Von Mühlen CA, Tan EM (1995).**
Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases.
Semin Arthritis Rheum 24: 323-358.

A: Pipettier Schema

		Kalibratoren (A-F)	Kontrollen	Proben
Pipettiere Pipettiere Pipettiere	Kalibratoren (A-F) Kontrollen vorverdünnte Proben (1:101)	je 100 µl	je 100 µl	je 100 µl
Inkubiere	30 min bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F)			
Dekantiere	3x mit 300 µl Waschpuffer waschen (1x)			
Pipettiere	Konjugat	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubiere	15 min bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F)			
Dekantiere	3x mit 300 µl Waschpuffer waschen (1x)			
Pipettiere	Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubiere	15 min bei Raumtemperatur(20-26°C/64-78.8°F), im Dunkeln.			
Pipettiere	Stopp Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubiere	5 min bei Raumtemperatur (20-26°C/64-78.8°F)			
Platte vorsichtig 5 Sekunden schütteln. Optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten messen (optional bei 450/620 nm). Die entstandene Farbe ist mindestens für 30 Minuten stabil.				

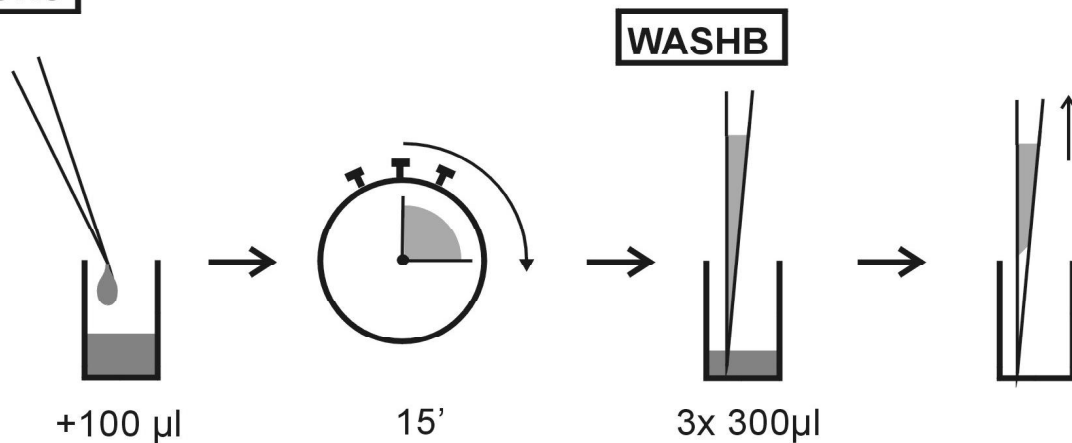
Samples (1:101) / Controls

1



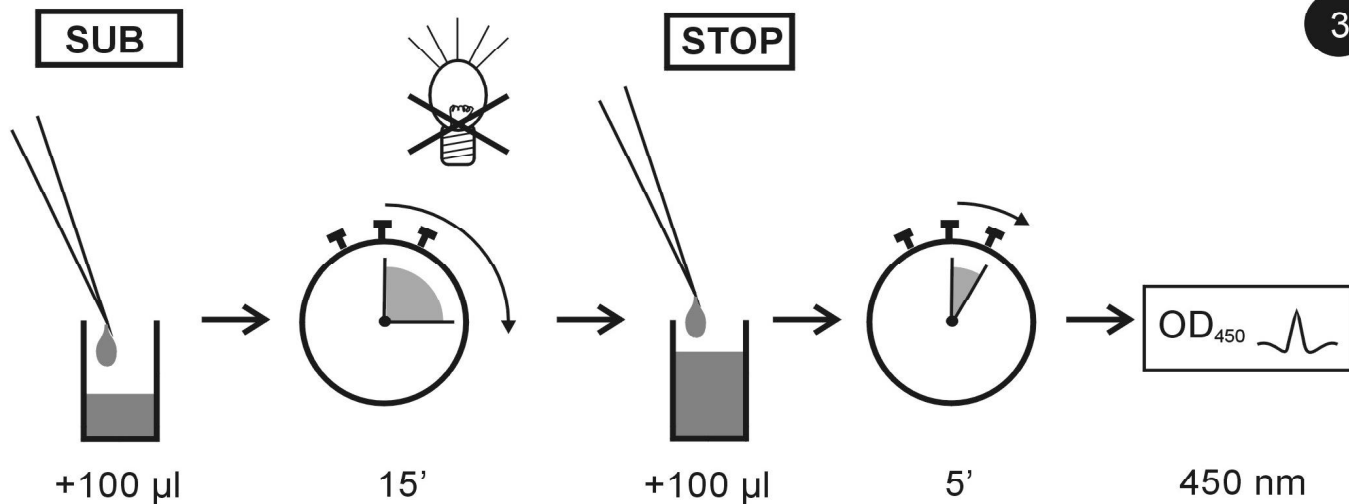
CONJ

2



SUB

3



Assay/Test: _____ Incubation / Inkub. : 1. _____ min Date/ Datum: _____

Temperature/Temperatur: _____ °F _____ °C Signature/Unterschrift: _____
Name: _____ 2. _____ min
3. _____ min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

IVD	◆ Per uso diagnostico in vitro ◆ Pour diagnostic in vitro ◆ In Vitro Diagnostikum	◆ For in vitro diagnostic use ◆ Para uso diagnóstico in vitro
REF	◆ Numero di catalogo ◆ Référence Catalogue ◆ Bestellnummer	◆ Catalogue number ◆ Numéro de catálogo
LOT	◆ Lotto ◆ Lot ◆ Chargen Bezeichnung	◆ Lot ◆ Lote
CE	◆ Marcatura di conformità CE ◆ Déclaration CE de Conformité ◆ Europäische Konformität	◆ EC Declaration of Conformity ◆ Declaración CE de Conformidad
96	◆ 96 tests ◆ 96 tests ◆ 96 Bestimmungen	◆ 96 tests ◆ 96 pruebas
i	◆ Vedere le istruzioni per l'uso ◆ Voir les instructions d'utilisation ◆ Gebrauchsanweisung beachten	◆ See instructions for use ◆ Ver las instrucciones de uso
Expiry date	◆ Scadenza ◆ Utilise avant le ◆ Verwendbar bis	◆ Expiry date ◆ Utilizar antes de
+2°C - +8°C	◆ Conservare a 2-8°C ◆ Conserver à 2-8°C ◆ Lagerung bei 2-8°C	◆ Store at 2-8°C (35-46°F) ◆ Conservar a 2-8°C
Manufactured by	◆ Prodotto da ◆ Fabriqué par ◆ Hergestellt von	◆ Manufactured by ◆ Fabricado por
CC	◆ Controllo del cut off ◆ Contrôle Seuil ◆ Grenzwert Kontrolle	◆ Cut off Control ◆ Control de cut-off
CONTROL +	◆ Controllo Positivo ◆ Contrôle Positif ◆ Positiv Kontrolle	◆ Positive Control ◆ Control Positivo
CONTROL -	◆ Controllo Negativo ◆ Contrôle Négatif ◆ Negativ Kontrolle	◆ Negative Control ◆ Control Negativo
CAL	◆ Calibratore ◆ Etalon ◆ Kalibrator	◆ Calibrator ◆ Calibrador
RC	◆ Recupero ◆ Corrélation ◆ Wiederfindung	◆ Recovery ◆ Recuperado
CONJ	◆ Conjugato ◆ Conjugé ◆ Konjugat	◆ Conjugate ◆ Conjugado
MP	◆ Micropiastra sensibilizzata ◆ Microplaque sensibilisée ◆ Beschichtete Mikrotiterplatte	◆ Coated microtiter plate ◆ Microplaca sensibilizada
PINP	◆ Pinplate sensibilizzata ◆ Pinplate sensibilisée ◆ Beschichtete Pinplatte	◆ Coated pinplate ◆ Pinplate sensibilizada
WASHB 50x	◆ Soluzione di lavaggio ◆ Solution de lavage ◆ Waschpuffer	◆ Wash solution ◆ solución de lavado
SUB	◆ Tampone substrato ◆ Tampon substrat ◆ Substratpuffer	◆ Substrate buffer ◆ tampón substrato
STOP	◆ Reagente bloccante ◆ Solution stop ◆ Stopreagenz	◆ Stop solution ◆ Reactivo bloqueante
SB 5x	◆ Diluete campioni ◆ Tampon échantillons ◆ Probenpuffer	◆ Sample buffer ◆ Tampón muestras

AESKU.INC 1083 Pinehurst Road - Grayson - GA - 30017 - U.S.A.