BlueDot ANA^{12} IgG

Bestellnummer: ANA12D-24

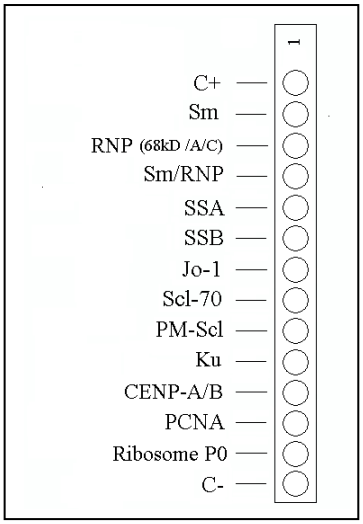
1. VERWENDUNGSZWECK

BlueDOT ANA^{12} IgG ist ein Immunodot-Kit für den Nachweis von IgG-Autoantikörpern in humanen Seren anhand der Antigene Sm, RNP(68kD/A/C), Sm/RNP, SSA(Ro), SSB (La), Jo-1 (histidyl-t-RNA Synthetase), Scl-70 (DNA Oopoisomerase I), PM-Scl, Ku, CENP-A/B (Zentromer A+B Proteine), PCNA und Ribosome P0.

Mehr Informationen über die Art der Antigene sind über Ihren Verteiler oder auf unserem Website www.d-tek.be (MSDS) erhältlich.

2. PRINZIP DES TESTS

Der Test beruht auf dem Prinzip eines Enzym-Immunassays. Der Teststreifen besteht aus einer Membran, die auf einem Kunststoffträger fixiert ist. Im Verlauf des Tests werden die Streifen mit den verdünnten Patientenseren inkubiert. Die humanen Antikörper, falls vorhanden, verbinden sich mit den entsprechenden spezifischen Antigenen auf der Membran. Ungebundene oder überschüssige Antikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden AP-konjugierte Antikörper von Ziegen gegen menschliches IgG auf die Streifen aufgebracht. Diese Enzyme binden an die Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einem zweiten Waschvorgang zum Entfernen überschüssigen Konjugats wird die Substratlösung hinzugegeben. Durch die Aktivität des Enzyms, sofern vorhanden, entwickeln sich purpurfarbene Punkte auf den Membranstreifen. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur Menge der Antikörper in der Probe.



3. KITINHALT

Abkürzungen:
TBS = Kochsalzlösung mit Tris-Puffer, BSA = Rinderserumalbumin, MIT = MethylIsothiazolon, AP = alkalische Phosphatase, NBT = NitroBlue Tetrazol, BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat.

ZU VERDÜNNEN :	**(10 x) Waschpufferlösung**	**1 x 40 ml** (farblos) *Enthält: TBS, Tween ; Konservierungsmittel : MIT*
GEBRAUCHSFERTIG :	**Teststreifen**	**24 Stück** *Je 14 Punkte:* *1 Negativkontrolle* **(C-)** *12 Antigene* *1 Positivkontrolle* **(C+)**
	Verdünnungspuffer	**1 x 40 ml** (gelb) *Enthält : TBS, BSA, Tween ; Konservierungsmittel : MIT*
	Konjugat	**1 x 40 ml** (rot) *Enthält : AP-konjugiertes Antihuman-IgG aus der Ziege, Konservierungsmittel: MIT*
	Substrat	**1 x 40 ml** (braune Flasche, hellgelbe Lösung) *Enthält: NBT/BCIP; Konservierungsmittel: 0.05 % NaN_3 (Natriumazid)*
	Inkubationsschalen	**3 Stück** *mit 8 Inkubationsrinnen*

4. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Wippschüttler / Mikropipetten / Timer / Meßzylinder / destilliertes oder entmineralisiertes Wasser / Pinzetten / Zellstoff bzw. Filterpapier

5. LAGERUNG

Die angemischte Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens einen Monat haltbar. Reagenzien und Streifen können bei 2-8 °C bis zum Ablaufdatum, das auf jeder Flasche bzw. jedem Röhrchen angegeben ist, aufbewahrt werden.
Legen Sie ungebrauchte Streifen zurück in das mitgelieferte Röhrchen, verschließen Sie es und bewahren Sie es bei 2-8 °C auf. Das Chromogen/Substrat (NBT/BCIP) sollte bei 2-8 °C gelagert werden.

6. VORSICHTSMAßNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur für "in vitro" diagnostische Zwecke bestimmt und dürfen nur von Fachpersonal verwendet werden. Der Kit enthält potenziell schädliche Komponenten. Vermeiden Sie daher Kontakt mit Haut, Augen oder Schleimhäuten. Patientenproben sollten immer als potenziell infektiös behandelt werden. Verwenden Sie keine anderen Reagenzien und benutzen Sie keine Streifen mit unterschiedlichen Chargennummern, um Abweichungen der Resultate zu vermeiden. Berühren Sie die Streifen nicht mit den Fingern. Verwenden Sie Pinzetten oder tragen Sie Laborhandschuhe. Lassen Sie die Reagenzien und Streifen Zimmertemperatur erreichen. Halten Sie die Inkubationszeiten genau ein. Handhaben Sie das Chromogensubstrat (NBT/BCIP) mit großer Sorgfalt, um jede Verunreinigung mit alkalischer Phosphatase zu vermeiden.

7. ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Proben sollten vorzugsweise frisch abgefüllt werden. Seren mit Verunreinigungen sollten mit niedriger Drehzahl zentrifugiert werden. Blutproben sollten in trockenen Röhrchen oder in Röhrchen mit EDTA oder Heparin abgefüllt werden. Nach der Abtrennung sollten die Serumproben unverzüglich verwendet werden. Andernfalls sind sie sofort aufzuteilen und können dann einige Tage bei 2-8 °C bzw. eingefroren bei -20 °C auch über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

8. TESTVERFAHREN

GRUNDSÄTZLICHE HANDHABUNG UND TIPPS ZUR HANDHABUNG:
Die Antigen- und Kontrollpunkte sind auf den Streifen blau vorgefärbt, um sicherzustellen, daß alle Antigene richtig auf die Membran aufgebracht sind. Diese **blaue Färbung verschwindet** im ersten Inkubationsschritt. Während der Inkubation mit dem Waschpuffer erscheint auf der Membran eine schwache rosa Hintergrundfärbung, die beim Trocknen am Ende der Abarbeitung wieder verschwindet.
Während der Inkubation muss die Schale **immer geschüttelt** werden um eine gründliche Zirkulation der Flüssigkeiten über der Membran zu gewährleisten. Ein **Wippschüttler** ist dafür das geeignete Gerät. Stellen Sie die Amplitude des Schüttlers so ein, daß keine Lösung aus den Rinnen überschwappt oder in benachbarte Rinnen gelangen kann.
Nach jeder Befüllung der Inkubationsrinnen kippen Sie die Inkubationsschale kurz von Hand bis die Streifen vollständig benetzt sind um evtl. anhaftende Luftbläschen unter den Streifen zu entfernen. Alternativ können Sie aufschwimmende Streifen durch Drücken (mit einer Pinzette oder Pipettenspitze) auf die Oberseite der Streifen, jedoch nicht an der Position der Antigene in die Lösung, untertauchen.

Vermeiden Sie jede Berührung der Membran des Streifens mit den Fingern, Pinzetten oder Pipetten. Fassen Sie die Streifen stets nur an der oberen beschrifteten Kunststoffzone an. Alle Arbeitsschritte sollen **bei Zimmertemperatur (20^0-24^0C)** stattfinden.

8.1 Vorbereitung der Reagenzien

1. Lassen Sie alle Komponenten Zimmertemperatur erreichen .
2. **Verdünnen** Sie die konzentrierte **Spülpufferlösung 10 x** mit **destilliertem Wasser.**
   Setzen Sie 15 ml verdünnte Spülpufferlösung pro Teststreifen.
   Beispiel: 1,5 ml konzentrierte Spülpufferlösung + 13,5 ml destilliertes Wasser für einen Streifen.

8.2 Abarbeitung des Tests

Hinweis: ALLE Inkubationsschritte müssen auf einem Wippschüttler stattfinden

1. **Setzen** Sie einen Streifen pro Patient in die Rinnen, mit den blauen Punkten **nach oben**
2. Je **2 ml Waschpufferlösung** pro Rinne pipettieren**. 10 min Inkubieren (Schütteln)**
   Nach ausreichender Inkubation verschwindet die blaue Färbung der Punkte völlig.
   Falls nicht, warten Sie, bis die Färbung der Punkte vollständig verschwunden ist.
3. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
   Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
4. Je **1,5 ml Probenverdünnungspuffer** pro Rinne pipettieren.
5. **Je 10 µl der unverdünnten Patientenprobe pipettieren**. **30 min Inkubieren. (Schütteln)**

Berühren Sie die Membran nicht mit der Pipettenspitze. Lassen Sie die Probe am besten über den oberen Teil der Streifen (Kunststoffzone) in die Lösung laufen.

***Hinweis**: Die Schritte 4 und 5 können durch Vorverdünnen der Probe in einem Glas- oder Kunststoffröhrchen zusammengefaßt werden (1,5 ml Lösungsmittel + 10 µl Patientenprobe → Mischen → in den Schacht geben).*

6. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
   Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
7. **3 x 3 Minuten** mit **je 1,5 ml Waschpufferlösung pro Rinne** inkubieren **(Schütteln)**
   Nach jedem Waschvorgang den Puffer durch langsames Umdrehen aus den Rinnen laufen lassen. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale mit Zellstoff.
8. Je **1,5 ml Konjugat** pro Rinne pipettieren. **30 min inkubieren (Schütteln)**
9. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
   Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
10. **3 x 3 Minuten** mit **je 1,5 ml Waschpufferlösung** pro Rinne inkubieren (siehe Schritt 6).
    Nach jedem Waschvorgang den Puffer durch langsames Umdrehen aus den Rinnen laufen lassen. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale mit Zellstoff.
11. Je **1,5 ml Substrat** pro Rinne pipettieren. **10 min inkubieren (Schütteln).**
12. **Dekantieren** Sie die Lösung aus den Rinnen.
    Drehen Sie die Schale langsam um, bis die Flüssigkeit herausgeflossen ist. Die Streifen bleiben am Boden der Rinnen haften. Trocknen Sie die Kante der Schale auf Zellstoff.
13. **1 x 3 Minuten** mit **1,5 ml Waschpufferlösung** pro Rinne inkubieren **(Schütteln),** um die Reaktion zu unterbrechen.
14. **Entnehmen** Sie die Streifen aus den Rinnen und trocknen Sie diese durch kurzes Andrücken auf Zellstoff oder Filterpapier.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

9.1 Auswertung

1. Lösen Sie die **Abdeckfolie** von der **selbstklebenden Rückseite** jedes Streifens und kleben Sie die Streifen mit den Punkten nach oben auf die entsprechend gekennzeichneten Felder des mitgelieferten Auswertungsbogens. Dieser zeigt die zugehörigen Positionen der unterschiedlichen Kontroll- und Antigenpunkte auf der Membran an.
2. **Prüfen Sie** den ersten oberen Punkt (**Positivkontrolle**): Er muss bei allen Patienten positiv sein.

   Nur ein eindeutig gefärbter Positivkontrollpunkt gewährleistet, daß Ihre Resultate gültig sind und der Test richtig verlaufen ist bzw. die Komponenten des Testsets nicht beeinträchtigt waren.
3. **Vergleichen** Sie die spezifischen **Antigenpunkte** mit dem **negativen Kontrollpunkt**, der immer am Ende der Reihe steht.

   Die Farbintensität der Antigenpunkte ist direkt proportional zum Gehalt des spezifischen Antikörpers in der Patientenprobe.

   Unter optimalen Bedingungen, und wenn die Probe gänzlich frei von störenden Matrixeffekten ist, kann der negative Kontrollpunkt u.U. fast farblos sein. Im Gegensatz dazu weisen stark gefärbte negative Kontrollpunkte auf einen hohen Anteil an unspezifischen Bindungen in der Probe hin.

POSITIVES RESULTAT: Eine Probe ist für einen spezifischen Antikörper dann positiv, wenn die Farbintensität des zugehörigen Antigenpunktes **sichtbar stärker** ist, als die Intensität des **negativen Kontrollpunkts**.

NEGATIVES RESULTAT: Eine Probe ist für einen spezifischen Antikörper negativ, wenn die Farbintensität des entsprechenden Antigenpunktes **schwächer oder gleich stark** der Intensität des **negativen Kontrollpunkts** ist.

10. TESTCHARAKTERISTIK

10.1 Reproduzierbarkeit

Hinweis: BlueDOT ist ein qualitativer Test, und die Genauigkeit des Ergebnisses wird anhand der Veränderung der sichtbaren Farbintensität der Punkte beurteilt. Die Farbintensität wird durch Sichtvergleich mit einer Vergleichsfarbskala (von 0 bis +5) beurteilt (Membranstreifen mit 6 vorgefärbten Referenzpunkten). Drei Kontrollseren (hoch, mittel, niedrig) wurden in statistisch relevanten Wiederholungen auf Ungenauigkeiten innerhalb eines Tests und zwischen verschiedenen Tests geprüft. Ausgewählte Seren wurden mit diesem Kit getestet und verdünnen linear. Aufgrund der heterogenen Eigenschaften humaner Autoantikörper ist es jedoch nicht auszuschließen, daß einzelne Proben dieser Regel nicht folgen. Detaillierte und aktualisierte Angaben sind auf Anfrage erhältlich.

10.2 Sensitivität und Spezifizität

Sensitivität: Sm, RNP(68kD /A/C),Sm/RNP, SSA, SSB, Jo-1, Scl-70, PMSCL, Ku, CENP-A/B, PCNA und Ribosome P0 >99%.
Spezifizität: Sm, RNP(68kD /A/C),Sm/RNP, SSA, SSB, Jo-1, Scl-70, PMSCL, Ku, CENP-A/B, PCNA und Ribosome P0 >99%.

Die Sensitivität wurde anhand klinisch definierter Bevölkerungsgruppen (positiver Befund mit krankheitsspezifischen Vergleichsmethoden bestätigt) festgestellt. Die Spezifizität wurde anhand von Kontrollgruppen geprüft, die einen Querschnitt der normal gesunden Bevölkerung darstellten sowie anhand klinisch definierter Kontrollgruppen. Nähere Angaben sind auf Anfrage erhältlich.

11. TESTBESCHRÄNKUNGEN

1. Eine Diagnose sollte keinesfalls ausschließlich auf Grundlage der Ergebnisse dieses Tests erfolgen.
2. Testergebnisse sollten immer in Verbindung mit einer vollständigen klinischen Bewertung und den Resultaten anderer diagnostischer Verfahren beurteilt werden.
3. D-tek und seine Verteiler sind nicht haftbar, weder direkt, indirekt noch konsequent, für Schäden die aufgrund unerlaubter Änderungen im Arbeitsverlauf entstanden sind. Der Kit soll nur von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden.
4. Die Grundsätze der GLP («Gute Labor Praxis») sollten durchgehend angewendet werden.

12. PANNENHILFE

Färbung erscheint nicht	- Benutzung von **konzentrierter** statt **verdünnter** Waschpufferlösung - Zu sehr verdünnte Proben - Benutzung verdünnten Konjugats (= gebrauchsfertig !) - Nicht-aktiviertes Konjugat
Hintergrundfärbung	- Schlechte Serumqualität: Partikeln, altes Serum, bakterielle Kontamination - Schritt 8.2.2 der Arbeitsanleitung war unzureichend oder ist vergessen worden - Unzureichender Waschvorgang - Inkubationszeit zu lang - Inkubationstemperatur zu hoch - Proben nicht genug verdünnt - Kontaminiertes NBT

Sollte dieser Kit aus irgendwelchem Grund außerhalb der Verantwortung der Testperson nicht korrekt funktionieren, wenden Sie sich bitte an Ihren Verteiler

13. BIBLIOGRAPHIE

Aktuelle Literatur erhalten Sie auf Anfrage. Bitte wenden Sie sich an info@d-tek.be

Letzte Änderung: 06/2010

Vertrieb durch:
Mast Diagnostica GmbH * Feldstraße 20 * DE-23858 Reinfeld * Tel: +49 (0)4533 2007 0 * Fax: +49 (0)4533 2007 68
mast@mast-diagnostica.de * www.mastgrp.com

D-tek sa • Parc Initialis • rue René Descartes 19 • BE-7000 Mons BELGIUM • T. +32 65 84 18 88 • F. +32 65 84 26 63 • info@d-tek.be
R.C. Mons 132.050 • T.V.A. BE 454.291.184 • BNP PARIBAS FORTIS IBAN BE21 0015 0659 4603 BIC GEBABEBB • ING IBAN BE58 3701 0463 3179 BIC BBRUBEBB
www.d-tek.be