



Gebrauchsanweisung

Titin Antibody ELISA

Enzymimmunoassay für die
Semi-Quantitative Bestimmung von
Anti-Titin-Antikörpern in Serum und Plasma

CE

IVD


Art. Nr. EA601/48



6 x 8



2 – 8 °C

REF TIT00  Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany











Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany

Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • contact@dld-diagnostika.de • www.dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung und Testprinzip	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
3	Lagerung und Haltbarkeit	4
4	Inhalt des Kits	5
5	Probengewinnung und –lagerung	6
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	6
7	Testdurchführung	7
8	Auswertung und Beurteilung	8
9	Testcharakteristika	9
10	Literatur	11
11	Änderungen	11
	Pipettierschema	12

Verwendete Symbole

	In-Vitro Diagnostikum		EG Konformitätserklärung
	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer des Herstellers		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole



1 Einführung und Testprinzip

Bei Patienten, die an Myasthenia gravis leiden, findet man in 80 % der Fälle Veränderungen des Thymus, bei ca. 10 % entwickelt sich die Thymusneoplasie in Form eines epithelialen Thymoms (TET, Thymuskarzinom). Die möglichst frühe Diagnose des Thymoms und die anschließende Thymektomie ist entscheidend für die Prognose dieser Patienten.

Die meisten dieser Patienten entwickeln neben den gut nachzuweisenden Acetylcholinrezeptor-Antikörpern zur Diagnose einer Myasthenia gravis (ACHRAB[®]-Assay), weitere Autoantikörper gegen die quergestreifte Muskulatur, unter anderem auch Antikörper gegen Titin.

Titin ist ein Protein der quergestreiften Muskulatur mit extrem großem Molekulargewicht. Die immunogenen Regionen des Titins liegen auf einem 30 kD Protein-Fragment und lassen eine Kreuzreaktivität mit den Epitopen der Acetylcholinrezeptoren vermuten (paraneoplastische Myasthenia gravis). Das rekombinant hergestellte MGT30 Peptid wird für den ELISA zum spezifischen Nachweis der anti-Titin-Antikörper eingesetzt.

Dieser ELISA-Test ist dem Immunfluoreszenz-Test (IFT) auf Schnitten quergestreifter Muskulatur (Human, Affe) deutlich überlegen.

Der Titin Antibody ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay. Während der Probeninkubation binden anti-Titin-Antikörper aus den verdünnten Patientenproben und Standards an rekombinantes Titin-Fragment (MGT30-Peptid), das auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten-Vertiefungen immobilisiert ist.

Nach einem Waschschrift wird Peroxidase-markiertes Protein A zugesetzt, welches an die anti-Titin-Antikörper bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird die gebundene Enzymmenge über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Dabei entsteht zunächst ein blauer Farbstoff. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach Gelb.

Die Extinktionen der Proben werden dann mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen und mit Hilfe des im Test eingesetzten Kalibrators ausgewertet.

2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.


3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4 Inhalt des Kits

MT-Streifen	STRIPS	6 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar Beschichtet mit rekombinantem MGT30-Peptid		
Kalibrator	CAL	1 Flasche
1 ml verdünntes Serum (1:101), gebrauchsfertig		
Negative Kontrolle	CON -	1 Flasche
1 ml verdünntes Serum (1:101), gebrauchsfertig		
Positive Kontrolle	CON +	1 Flasche
1 ml verdünntes Serum (1:101), gebrauchsfertig		
Probenverdünnungspuffer	DIL	1 Flasche
55 ml, gebrauchsfertig		
Enzymkonjugat	CONJ	1 Flasche
6 ml, gebrauchsfertig, Protein-A konjugiert an Peroxidase		 Achtung
Waschpuffer	WASH	1 Flasche
50 ml, Konzentrat (10x)		
Substrat	SUB	1 Flasche
6 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig		
Stopplösung	STOP	1 Flasche
6 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure		

Zusätzlich benötigte Materialien (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 100 µl und 1 ml
- Multipette
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm und 405 nm)

- Horizontalschüttler, Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspizen, Stoppuhr

5 Probengewinnung und –lagerung

5.1 Serum und Plasma

Für den Test sollte nur Serum oder Plasma eingesetzt werden, dabei sind die Vorschriften des Blutentnahmesystemherstellers zu beachten.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutentnahme sind einzuhalten.

Es sollten frisch gewonnene Proben verwendet werden. Falls notwendig, können Serum- bzw. Plasmaproben bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren soll vermieden werden. Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht verwendet werden.

6 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Den Kit-Inhalt auf Raumtemperatur bringen.

6.1.1 Waschpuffer

Inhalt (50 ml) der Flasche WASH mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Die Patientenproben müssen für die Messung 1:101 mit Probenverdünnungspuffer DIL verdünnt werden (z.B. 10 µl Probe + 1000 µl Probenverdünnungspuffer). Verdünnte Proben, die für eine eventuelle Wiederholungsmessung aufbewahrt werden sollen, müssen eingefroren werden.

7 Testdurchführung

1. Jeweils 100 µl des gebrauchsfertigen Kalibrators **CAL**, 100 µl der gebrauchsfertigen Kontrollen **CON -** & **CON +** und 100 µl der 1:101 verdünnten Proben (s. 6.2), vorzugsweise als Doppelbestimmungen, in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren. **Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.**
2. 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
3. Vertiefungen entleeren, mit je ca. 300 µl **verdünntem** Waschpuffer **WASH** füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf ein saugfähige **Unterlage** (Papierhandtuch) **legen und kurz ausklopfen**, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. **Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.** Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
4. Jeweils 100 µl Enzymkonjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
5. **Platte** 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Waschen: **wie unter Punkt 3 beschrieben.**
7. Jeweils 100 µl Substrat **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
8. **20 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.
9. Jeweils 100 µl Stopplösung **STOP** in jede Vertiefung hinzufügen; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung. **10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.**
10. **Platte im Photometer bei 450 nm** (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von **15 Minuten** messen. Proben, deren OD bei 450 nm über 2,5 liegt, sollten zusammen mit dem Kalibrator bei 405 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) erneut gemessen und ausgewertet werden.

8 Auswertung und Beurteilung

Die gemessene optische Dichte (OD) der Proben wird auf die optische Dichte des Kalibrators bezogen und als Faktor F angegeben.

$$\text{Faktor}_{\text{Probe}} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{\text{Kalibrator}}}$$

Proben, deren OD bei 450 nm über 2,5 liegt, sollten bei 405 nm erneut gemessen und auf die ebenfalls bei 405 nm gemessene OD des Kalibrators bezogen werden.

Patientenwerte (Faktor F) $\geq 1,0$ sind als positiv und alle Werte $< 1,0$ sind als negativ zu bewerten.

Beispiel (nicht für die Auswertung verwenden):

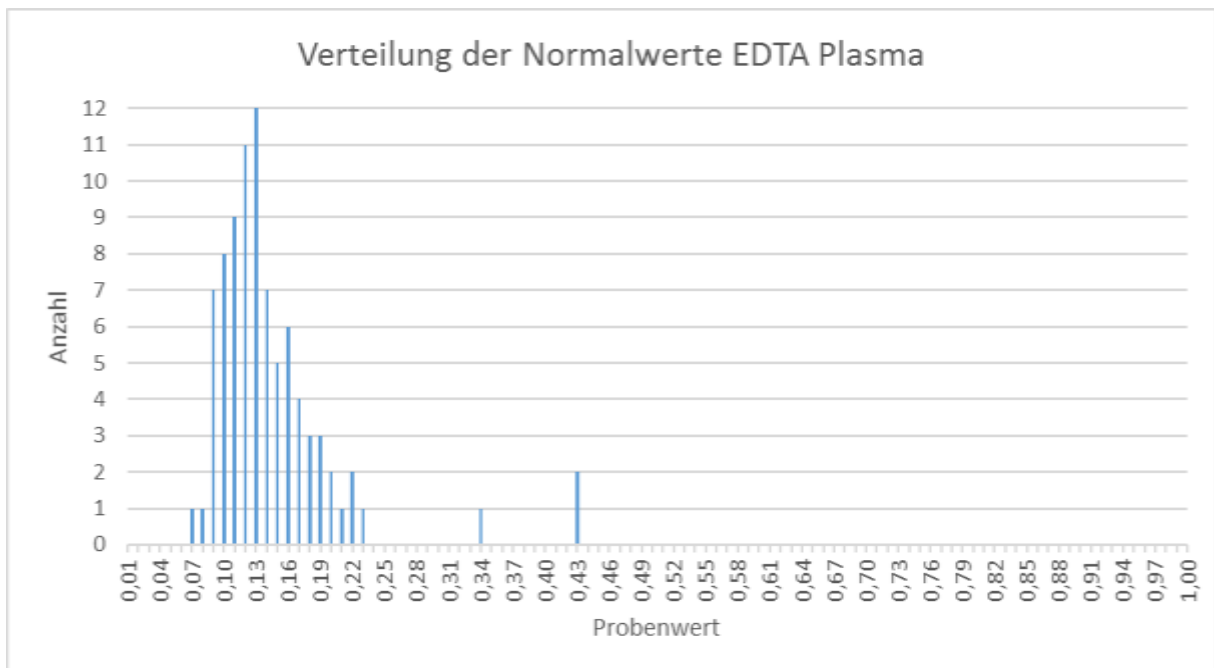
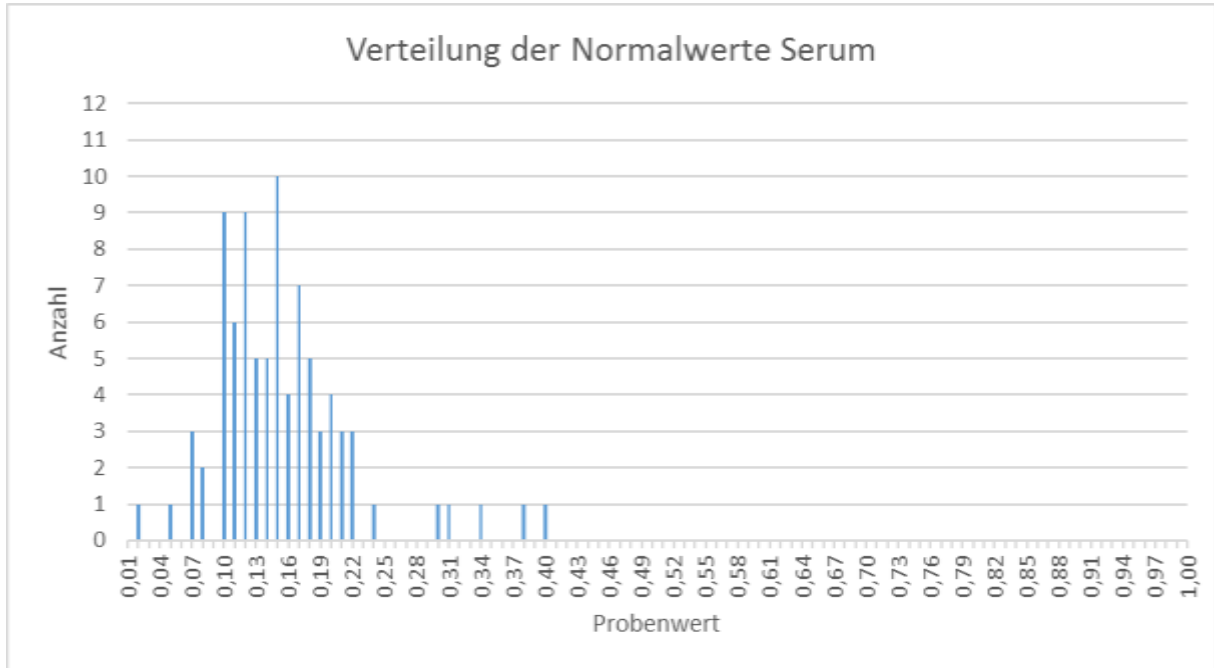
	OD_{Probe}	$\frac{\text{OD}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{\text{Kalibrator}}}$	Bewertung
Kalibrator	1,241	1,0	
Negativ-Kontrolle	0,287	0,23	-
Positiv-Kontrolle	2,346	1,89	+
Probe 1	0,826	0,67	-
Probe 2	1,710	1,38	+

9 Testcharakteristika

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Messung von je 86 Normalseren und EDTA-Plasmen aufgeführt. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der Normalwerte dargestellt.

Der Referenzbereich wird mit Faktor $F < 1,0$ angegeben.

Verteilung der Normalwerte



9.1 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten ermittelt.

(Angabe der Werte als $OD_{\text{Probe}}/OD_{\text{Kalibrator}}$)

9.1.1 Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	40	1,87	0,054	2,9
2	40	0,19	0,005	2,4

9.1.2 Inter-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
1	20	0,11	0,015	14,0
2	20	0,11	0,010	9,2
3	20	0,20	0,025	12,7
4	20	0,69	0,055	8,1
5	20	1,03	0,102	9,9
6	20	1,03	0,089	8,6
7	20	1,06	0,102	9,6
8	20	1,09	0,082	7,5
9	20	1,47	0,089	6,1
10	20	1,46	0,093	6,4
11	20	1,68	0,099	5,9
12	20	2,00	0,197	9,8

9.2 Linearität

Proben, die Titin-Antikörper enthalten, zeigen kein lineares Verdünnungsverhalten im Titin Antibody ELISA.

9.3 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des Titin Antibody ELISAs ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

9.4 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10 Literatur

- E Lübke, A Freiburg, GO Skeie, B Kolmerer, S Labeit, JA Aarli, NE Gilhus, R Wollmann, M Wussling, JC Ruegg, WA Linke
Striational autoantibodies in myasthenia gravis patients recognize I-band titin epitopes
J Neuroimmunol 1998;81:98-108
- RD Voltz, WC Albrich, A Nägele, F Schumm, M Wick, A Freiburg, M Gautel, HT Thaler, J Aarli, Th Kirchner, R Hohlfeld
Paraneoplastic myasthenia gravis: Detection of anti-MGT30 (titin) antibodies predicts thymic epithelial tumor
Neurology 1997;49:1454-1457
- M Gautel, A Lakey, DP Barlow, Z Holmes, S Scales, K Leonard, S Labeit, A Mygland, NE Gilhus, JA Aarli
Titin antibodies in myasthenia gravis: Identification of a major immunogenic region of titin
Neurology 1993;43:1581-1585

11 Änderungen

Version _10: Änderungen sind grau unterlegt.

Version _9: Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert.

Version _8: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Einzelne Passagen wurden umformuliert, um die Verständlichkeit zu verbessern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

Pipettierschema

		Kalibrator	Kontrollen	Proben
STRIPS:				
CAL	μl	100		
CON - & CON +	μl		100	
Verdünnte Probe	μl			100

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen

CONJ	μl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen

SUB	μl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

STOP	μl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln
Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref. 570 – 650 nm)