



Arbeitsanleitung

Aquaporin-4 (AQP4) Antibody ELISA

**Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
AQP4-Autoantikörpern
in Serum**



REF EA111/96

 12 x 8

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany • Tel.: +49 40 5558710 • Fax: +49 40 55587111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • e-mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Klinische Bedeutung und Testprinzip	Seite	3
2.	Vorsichtsmaßnahmen	Seite	3
3.	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	4
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	4
5.	Probengewinnung und Aufbewahrung	Seite	5
6.	Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Seite	6
7.	Testdurchführung	Seite	7
8.	Testauswertung	Seite	8
9.	Testcharakteristik	Seite	9
10.	Referenzbereich	Seite	10
11.	Literatur	Seite	11
	Pipettierschema	Seite	12

Verwendete Symbole

 In-Vitro-Diagnostikum

 Inhalt

 Chargenbezeichnung



Hersteller

 Bestellnummer



CE markiert



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Gebrauchsanweisung beachten

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Die Neuromyelitis optica (auch Devic-Syndrom) ist eine autoimmun bedingte entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems mit Abbau der isolierenden Nervenummantelungen (Demyelinisierung), bei der zumeist innerhalb weniger Monate (meist < 2 Jahre) nacheinander oder gleichzeitig sowohl eine Entzündung mindestens eines Sehnervs (Neuritis nervi optici) als auch eine Entzündung des Rückenmarkes (Myelitis) auftritt. Sehr häufig finden sich Antikörper gegen den Wasserkanal Aquaporin-4. Sind diese Autoantikörper im Serum nachzuweisen, ist eine sichere Abgrenzung zur Multiplen Sklerose einfacher.

Im AQP4 Autoantikörper ELISA binden die AQP4-Antikörper im Patientenserum, Standards und Kontrollen an die mit AQP4 (M23 Isoform) beschichtete Mikrotiterplatte und dem biotinylierten AQP4 in flüssiger Phase.

Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand verworfen. Der an der Mikrotiterplatte gebundene AQP4-Biotin-Autoantikörper Komplex wird in einem zweiten Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD) und nachfolgender Zugabe des Substrats TMB detektiert.

Der Enzymimmunoassay für den quantitativen Nachweis von Aquaporin-4-Autoantikörpern ist durch folgende Patente geschützt: US Patent 7,101,679 und 7,947,254, European patent 1700120. Weitere Patente und Patentanmeldungen in anderen Ländern sind in Vorbereitung.

2. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen

werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

- 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.

3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien. Direkte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden.

Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen bzw. Kit angegeben. Bei größeren Ansätzen möglichst nur Reagenzien einer Charge verwenden.

4. Inhalt des Testbestecks

- 4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Streifen
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar, beschichtet mit AQP4; M23 Isoform

- 4.2 **Standards A – E** **CAL A** – **CAL E** 5 Fläschchen
je 0,7 ml , gebrauchsfertig
Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
U/ml	1,5	5	20	40	80

- 4.3 **Positive Kontrollen** **CONTROL I** + **CONTROL II** 2 Fläschchen
Je 0,7 ml, gebrauchsfertig
Zielwerte und -bereiche sind im QC-Blatt aufgeführt
- 4.4 **Negative Kontrolle** **CON -** 1 Fläschchen
0,7 ml, gebrauchsfertig

4.5	AQP4-Biotin 1,5 ml pro Fläschchen, lyophilisiert	AQP4-BIOTIN	3 Fläschchen
4.6	Rekonstitutionspuffer 10 ml, gebrauchsfertig zum Auflösen des AQP4-Biotin	RECONST	1 Fläschchen
4.7	Streptavidin-Peroxidase 0,8 ml, 20 x konzentriert	SA-POD	1 Fläschchen
4.8	Verdünnungspuffer 15 ml, gebrauchsfertig zum Verdünnen von SA-POD	DIL	1 Fläschchen
4.9	Substrat 15 ml, Tetramethyl-Benzidin (TMB), gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.10	Waschpuffer 120 ml, 10 x konzentriert	WASH	1 Fläschchen
4.11	Stopplösung 14 ml, gebrauchsfertig	STOP	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten (25, 50, 100 µl)
- Schüttler mit 500 rpm geeignet für ELISA Platten, kein Orbitalschüttler
- Vortex-Mischer
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 und 405 nm)
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test soll Serum eingesetzt werden. Citrat, EDTA und Heparinplasma kann ebenfalls eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden. Proben, die eine Trübung zeigen, sollten vor dem Test zentrifugiert werden.

Die Proben sollten bald nach Gewinnung eingesetzt werden und können eingefroren bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Mikrotiterstreifen

STRIPS

Vor Öffnen der Mikrotiterstreifen sollten die Päckchen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach Öffnen ungenutzte Streifen zurück in die Originalverpackung legen und gut verschließen. Den Beutel dann in den beiliegenden Clipbeutel mit dem Trockenmittel legen, gut verschließen und bei 2-8 °C bis zu 4 Monate lagern.

AQP4-Biotin

AQP4-BIOTIN

Unmittelbar vor Gebrauch Inhalt jedes Fläschchens mit 1,5 ml Rekonstitutionspuffer auflösen. Wenn mehr als ein Fläschchen benötigt wird, den Inhalt mehrerer Fläschchen poolen und gut mischen. Nicht genutzte Lösung verwerfen. Eine Lagerung des gelösten AQP4-Biotin ist nicht möglich.

Streptavidin-Peroxidase

SA-POD

SA-POD mit 1:20 mit Verdünnungspuffer verdünnen (z.B. 0,5 ml SA-POD + 9.5 ml Puffer). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 °C für 16 Wochen haltbar.

Waschpuffer

WASH

Waschpuffer 1:10 mit destillierten Wasser verdünnen. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

7. Testdurchführung

Vor der Testdurchführung alle Komponenten des Tests mindestens für 30 Minuten auf Raumtemperatur bringen.

1. 50 µl (Doppelbestimmung) unverdünnte Patientenseren, Standard A bis E, Negative und Positive Kontrollen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Eine Vertiefung für Blank-Wert freilassen.
2. 25 µl des rekonstituierten AQP4-Biotin in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren, die Mikrotiterplatte abdecken und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen.
4. 100 µl verdünnte SA-POD Lösung in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren. Mikrotiterstreifen abdecken und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Schüttler bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) inkubieren
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 2 x durchführen. Um restlichen Schaum zu entfernen, Vertiefungen mit 300 µl dest. Wasser füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
6. 100 µl Substratlösung (TMB) in jede Vertiefung pipettieren (inkl. Blank) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen ohne Schütteln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung (inkl. Blank) pipettieren und für 5 Sekunden auf dem Schüttler mischen.
8. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm und 405 nm gegen den Blankwert (100 µl Substrat + 100 µl Stopplösung) messen.

8. Testauswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in U/ml abgelesen werden.

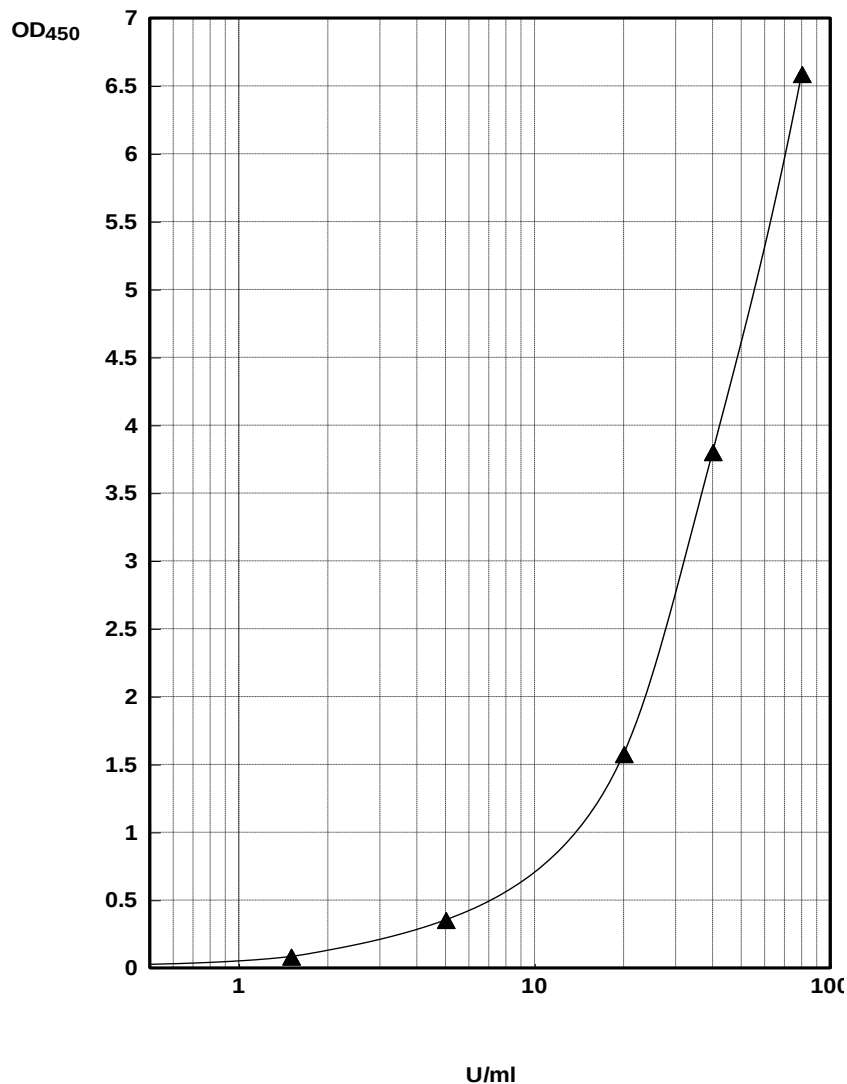
Für die Auswertung kann für die Negative Kontrolle ein Wert von 0,15 U/ml angenommen werden.

Patientenproben mit AQP4 Autoantikörperkonzentrationen über 80 U/ml können mit Serum, das keine AQP4 Autoantikörper enthält, typischerweise 1:10 oder 1:100 verdünnt werden. Einige Seren werden dabei nicht linear verdünnen.

Typisches Beispiel

Typische Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	OD 450 nm	Konz. U/ml
Negative Kontrolle	0,021	
Standard A	0,085	1,5
Standard B	0,354	5
Standard C	1,577	20
Standard D	3,802	40
Standard E	6,588	80
Positive Kontrolle I	0,755	12,0
Positive Kontrolle II	2,506	28



9. Testcharakteristik

Klinische Spezifität

Proben von 358 gesunden Blutspendern wurden im AQP4 Autoantikörper ELISA gemessen. In keiner von 356 gesunden Kontrollen wurden AQP4 Autoantikörper gefunden (99% Spezifität).

Klinische Sensitivität

Proben von 62 Patienten mit NMO oder verwandten Erkrankungen wurden in dem AQP4 Antikörper ELISA gemessen. In 48 Proben (77%) wurden AQP4 Autoantikörper gefunden.

Untere Nachweisgrenze

Die negative Kontrolle wurde 20 fach gemessen und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei der 2fachen Standardabweichung lag bei 0,17 U/ml.

Klinische Richtigkeit

Die Messung von 205 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen ohne NMO oder NMOSD zeigten keine Kreuzreaktion mit dem AQP4 Ab ELISA. Gemessen wurden Seren mit Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor (n=110), Glutamic Acid Decarboxylase GAD (n=26), 21-Hydroxylase (n=12), Acetylcholinrezeptor (n=10), Thyroid Peroxidase TPO (n=15), Thyreoglobulin Tg (n=10), IA2 (n=7) und Seren mit positivem Rheumafaktor (n=15).

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=25)

Probe	Mittelwert U/ml	VK (%)
1	3,9	7,7
2	7,0	8,6
3	28	3,2
4	58	3,1

Inter-Assay (n=20)

Probe	Mittelwert U/ml	VK (%)
1	5,0	15,6
2	13,3	10,5
3	35	7,9
4	59	7,5

10. Referenzbereich

Negativ < 3,0 U/ml
Positiv ≥ 3,0 U/ml

11. Literatur

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

N. Isobe et al.

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

Multiple Sclerosis Journal 2012

DOI: 10.1177/1352458512443917

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

Pipettierschema

	B ₀	Standard A - E	Positive Kontrollen I/II	Patienten -serum
Negative Kontrolle μl	50			
Standard A-E μl		50		
Positive Kontrollen μl			50	
Patientenserum μl				50

AQP4-Biotin μl	25	25	25	25
---------------------------	----	----	----	----

2 Stunden bei Raumtemperatur auf Schüttler (500 rpm) inkubieren
entleeren, 3 x waschen mit 300 μl Waschpuffer

SA-POD μl	100	100	100	100
----------------------	-----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur auf Schüttler (500 rpm) inkubieren
entleeren, 2 x mit 300 μl Waschpuffer, 1x mit dest Wasser waschen

TMB-Substrat μl	100	100	100	100
----------------------------	-----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen (ohne Schütteln!) inkubieren

Stopplösung μl	100	100	100	100
---------------------------	-----	-----	-----	-----

5 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm und 405 nm innerhalb von 5-10 Minuten