AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

GEBRAUCHS - ANWEISUNG

AESKUSLIDES® ANCA

Ref 54.xxx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

GEBRAUCHSANWEISUNG

ANCA

Standard-Ref.	Beschreibung	Tests
54.100	**ANCA Ethanol** (12 Kavitäten)	120
54.101	**ANCA Formalin** (12 Kavitäten)	120
54.050	**ANCA Ethanol** (6 Kavitäten)	60
54.051	**ANCA Formalin** (6 Kavitäten)	60

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Inhaltsverzeichnis

1. VERWENDUNGSZWECK 1
2. KLINISCHE ANWENDUNG 1
3. ANWENDUNG DES KITS 3
4. AUSWERTUNG 3
5. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE 3
5.1 Sensitivität/Spezifität 3
5.1 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit 4
6. DATENAUSWERTUNGSBOGEN 5
7. INHALT DER KITS 6
8. INHALT DER STANDARDREAGENZIEN 7
a. Standardreagenzien 7
b. Zusätzlich erforderliches Material 7
9. LAGERUNG UND HALTBARKEIT 8
10. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 8
c. Gesundheitsrisiko 8
d. Allgemeine Hinweise 9
11. PROBENENTNAHME, VORBEREITUNG UND LAGERUNG 9
12. TESTDURCHFÜHRUNG 10
e. Vorbereitung 10
f. Testdurchführung 11
g. Arbeitsablauf 12
13. FEHLERBEHEBUNG 13
14. REGULATORISCHE SYMBOLE 14

ANCA

1. VERWENDUNGSZWECK

AESKUSLIDES® **ANCA** ist ein indirekter Immunfluoreszenzassay zur Feststellung von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) in Humanserum.

Der Assay ist ein Mittel zur Differentialdiagnose von ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) wie beispielsweise Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)[1], mikroskopische Polyangiitis und das Churg-Strauss-Syndrom.

2. KLINISCHE ANWENDUNG

Die Abkürzung ANCA (antineutrophile zytoplasmatische Antikörper) steht für eine Gruppe von Antikörpern gegen unterschiedliche Bestandteile neutrophiler Granulozyten and Monozyten. Zur Feststellung von ANCAs wurden bisher als etabliertes Verfahren indirekte Immunfluoreszenztests basierend auf Ethanol-fixierten Neutrophilen verwendet. Es zeigte sich, dass manche ANCAs zytoplasmatische Fluoreszenzmuster (C-ANCAs genannt) entwickeln, wohingegen andere perinukleäre Muster (P-ANCAs) auf Ethanol-fixierten Neutrophilen zeigen. Da beide Muster mehrere Antigene umfassen können, reicht Immunofluoreszenz nicht zu einer befriedigenden Differentialdiagnose von Vaskulitis aus. Daher sollte jeder Immunfluoreszenztest (IFT) mit speziellen ELISA-Tests überprüft werden[2,3].

Einige ANCAs erzeugen ein atypisches Muster, welches nur schwer von einem durch antinukleäre Antikörper (ANA) erzeugtem Muster auf ethanol-fixierten Granulozyten zu differenzieren ist. Um diese besser unterscheiden zu können, werden Formalin-fixierte Neutrophile eingesetzt. ANCAs, die auf Ethanol-fixierten Neutrophilen P-ANCA-/A-ANCA-Färbungen entstehen lassen, werden ein zytoplasmatisches Muster erzeugen, wenn Formalin-fixierte Neutrophile als Substrat verwendet werden. Wenn das Färbungsmuster negativ ist, sollte ein Test mit HEp2-Zellen auf ANAs durchgeführt werden.[4]

Myeloperoxidase (MPO) wurde als bedeutendstes P-ANCA-Antigen (MPO-ANCA) bestimmt. Andere zelluläre Bestandteile wie Lactoferrin, Cathepsin G, Lysozym and Elastase führen jedoch ebenso zu einer perinukleären Färbung und gehören daher zur Gruppe der P-ANCAS. Sie werden allerdings nicht spezifisch mit AAVs in Verbindung gebracht und könnten bei der Differenzialdiagnose anderer, nicht mit Vaskulitis assoziierten Krankheiten eine Rolle spielen.[5]

---

[1] Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC et al. Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's Granulomatosis. Arthritis Rheum 2011; 63: 863-864.
[2] Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-513.
[3] Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am J Clin Pathol 2003; 120: 312-318.
[4] Csernok E, Holle JU. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? Autoimmun Highlights 2010; 1: 39-43.
[5] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. Clin Exp Immunol 1995; 101 Suppl 1: 15-17.

Demgegenüber ist Proteinase 3 das Hauptzielantigen der C-ANCAs (PR3-ANCA).[6] Ein anderes Antigen, das C-ANCAs erzeugen könnte, ist BPI (bakterizides/Permeabilität steigerndes Protein).[7]

ANCAs werden häufig bei Patienten mit mikroskopischer Polyangiitis festgestellt (60 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA), sowie bei Patienten, die am Churg-Strauss-Syndrom leiden (30 % MPO-ANCA, 30 % PR3-ANCA).[8] Autoantikörper gegen PR3 sind spezifische serologische Marker für Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener). Hierbei weisen 50 % (lokalisierte Krankheit) bis 95 % (generalisierte Krankheit) PR3-ANCAs auf.[9]

Antikörper gegen andere im Hinblick auf ANCAs relevante Antigene wie beispielsweise Lactoferrin, Cathepsin G, Elastase und BPI wurden mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Eine eindeutige klinische Relevanz wird jedoch noch untersucht. Im Falle von Antielastase-Antikörpern, zeigte sich ein Zusammenhang mit kokain-induzierten destruktiven Mittelgesichtsschädigungen (cocaine-induced midline destructive lesions - CIMDL).[10]

Antigencharakterisierung: menschliche Neutrophile (Granulozyten), entweder Ethanol- oder Formalin-fixiert

Kreuzreaktivität: Wie im Kapitel über die klinische Anwendung beschrieben, kann das Vorhandensein von ANAs Fluoreszenzmuster entstehen lassen, die mit P-ANCAs/A-ANCAs verwechselt werden können. Sonst liegt keine Kreuzaktivität vor.

Der Test beruht auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz:

Objektträger sind mit Gewebeschnitten oder Zellen (HEp2 zur Bestimmung von ANA, Granulozyten zur Bestimmung von ANCA oder Crithidia luciliae zur Bestimmung von anti-nDNA Antikörpern) beschichtet. Enthält ein Patientenserum Antikörper gegen Bestandteile der Gewebe oder Zellen, so binden diese im ersten Inkubationsschritt an das entsprechende Substrat auf dem Objektträger. Ungebundene Serumbestandteile werden in einem Waschschritt entfernt. Die gebundenen Patientenantikörper werden in einem zweiten Inkubationsschritt durch Fluorescein markierte Anti-human Immunglobuline nachgewiesen, welche an die gebundenen Patientenantikörper binden und diese durch ihren Fluoreszenz-Farbstoff sichtbar machen. Es resultiert eine spezifische grüne Fluoreszenz der Antigen-Antikörper-Komplexe, die unter einem Immunfluoreszenz-Mikroskop sichtbar werden.

[6] Gross WL, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. APMIS 1995; 103: 81-97.

[7] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. Clin Exp Immunol 1995; 99: 49-56.

[8] Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Lancet 2006; 368: 404-418.

[9] Holle JU, Csernok E, Gross WL. Wegener Granulomatosis. 2008; In: Diagnostic Criteria in autoimmune Diseases, Shoenfeld Y, Cervera R, and Gershwin ME, eds. Humana Press, pp. 99-102.

[10] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, Jenne DE, Trimarchi M, Gregorini G et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. Arthritis Rheum 2004; 50: 2954-2965.

3. ANWENDUNG DES KITS

Für detaillierte Anweisungen lesen Sie bitte das Testverfahren in Kapitel 12 der Bedienungsanleitung. Die im Folgenden angeführten Angaben sollten für die ANCA-Kits angewendet werden:

- Gegenfärbungszeit: 30-90 Sekunden
- Empfohlener Screening-Titer
  - 1:20

4. AUSWERTUNG

Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) spielen bei der Bewertung von Gefäßkrankheiten bei Patienten eine essenzielle Rolle.

Der geeignete Endtiter ist der, in dem das Patientenserum eine einfach positive Fluoreszenz aufweist. Proben, die niedrige Fluoreszenzen mit Titern zwischen 1:20 und 1:80 oder nicht eindeutige Werte im Hinblick auf klinische Ergebnisse haben, sollten in regelmäßigen Abständen überprüft werden. In derartigen Fällen sollten alle 3 Wochen Proben genommen und auf ähnliche Weise getestet werden.

1:20	25 µL Serum	+	475 µL Probenpuffer
1:40	20 µL Serum	+	780 µL Probenpuffer (bzw. 1:2 der „1:20"-Verdünnung)
1:80	10 µL Serum	+	790 µL Probenpuffer (bzw. 1:2 der „1:40"- Verdünnung)
1:160	10 µL Serum	+	1590 µL Probenpuffer (bzw. 1:2 der „1:80"- Verdünnung)

etc.

Das klassische C-ANCA-Muster weist eine granuläre homogene zytoplasmatische Färbung mit minimaler Färbung des nukleären Bereichs auf.

Das P-ANCA-Muster weist eine deutlich abgegrenzte perinukleäre Färbung (Ethanol-fixierte Neutrophile) oder ein C-ANCA zytoplasmatisches Muster (Formalin-fixierte Neutrophile) auf.

5. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

5.1 Sensitivität/Spezifität

***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** und **ANCA Formalin** wurden mit anderen im Handel erhältlichen indirekten Immunfluoreszenztestsystemen unter Verwendung von Ethanol- und Formalin-fixierten Neutrophilen verglichen. 132 Seren von Patienten, bei denen eine ANCA-assoziierte Vaskulitis diagnostiziert wurde, und 375 Seren von Patienten mit anderen Krankheiten (nicht gesunde Kontrollen) wurden manuell analysiert und von zwei Lesern bewertet. Zur Bestimmung positiver Proben wurde eine Cut-off-Verdünnung von 1:20 verwendet. Die klinischen Proben repräsentierten ein breites Spektrum von Autoimmunerkrankungen.

Für ANCA Ethanol ergaben sich folgenden Ergebnisse:

		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
***AESKUSLIDES®* ANCA Ethanol**	**Positiv**	145	34	179
	Negativ	71	257	328
	Gesamt	216	291	507

Sensitivität = 145/216 = 67,1 % (95 % CI: 60,6 – 73,0 %)
Spezifität = 257/291 = 88,3 % (95 % CI: 84,1 – 91,5 %)

Für ANCA Formalin ergaben sich folgenden Ergebnisse:

		Vergleichsprodukt		
		Positiv	Negativ	Gesamt
***AESKUSLIDES®* ANCA Formalin**	**Positiv**	66	35	101
	Negativ	16	390	406
	Gesamt	82	425	507

Sensitivität = 66/82 = 80,5 % (95 % CI: 70,6 – 87,6 %)
Spezifität = 390/425 = 91,8 % (95 % CI: 88,8 – 94,0 %)

95 % confidence intervals are score confidence intervals according to Wilson's method[11].

5.1 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit von ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** und **ANCA Formalin** wurden Studien innerhalb eines Labors, zwischen verschiedenen Laboren und zwischen verschiedenen Chargen durchgeführt. Acht Serumproben wurden mit ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** untersucht. Für ***AESKUSLIDES*® ANCA Formalin** wurden zehn Proben verwendet. Der Probensatz mit negativen, niedrig, mittel und hoch positiven Proben, die zwei verschiedene Muster (P-ANCA und C-ANCA) repräsentieren, wurde manuell und mit dem **HELIOS® Automated IFA System** bearbeitet und von zwei Leser ausgewertet. Für Studien innerhalb eines Labors und zwischen verschiedenen Laboren wurden die Proben an fünf Tagen getestet, mit zwei Durchläufen pro Tag und drei Wiederholungen pro Durchlauf an drei Studienorten. Um die Variabilität zwischen den Chargen zu demonstrieren, wurden die ***AESKUSLIDES*® ANCA Ethanol** und **ANCA Formalin** Proben in zehn Wiederholungen mit drei verschiedenen Kit-Chargen getestet. Die positiven und negativen Übereinstimmungen lagen bei ≥ 90 %. Die Proben zeigten in allen getesteten Kavitäten einheitliche Muster und Fluoreszenzintensitäten.

[11] Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. Journal of the American Statistical Association, 22(158), 209–212. https://doi.org/10.2307/2276774

6. DATENAUSWERTUNGSBOGEN

ANCA

Datum:	Charge:	Fixierung
Objektträger-Nr.:	Durchführender:	Ethanol: ☐ Formalin: ☐

Well Nr.	ID	Verdünnungsfaktor	F.I.	Nukleoplasma	Zytoplasma	Antikörper	Bemerkungen
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

7. INHALT DER KITS

		OBJEKTTRÄGER				KONJUGAT			POSITIVKONTROLLE		
Kit-Ref.	**Kit-Beschreibung**	**Ref.**	**Wells**	**Beschichtung**	**Menge**	**Ref.**	**Beschreibung**	**Menge**	**Ref.**	**Beschreibung**	**Menge**
54.100	**ANCA Ethanol (12 Kavitäten)**	**S54.100**	12	humane Neutrophile (Ethanolfixierung)	10	**C54.100**	**IgG** Blauer Verschluss: leicht bläuliche Lösung. Enthält: BSA, Tween, Fluorescein (FITC) markiert antihuman-Antikörper	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	ANCA-Muster-Kontrolle C-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA-Muster-Kontrolle P-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	
54.101	**ANCA Formalin (12 Kavitäten)**	**S54.101**	12	humane Neutrophile (Formalinfixierung)	10	**C54.101**	**IgG** Blauer Verschluss: leicht bläuliche Lösung. Enthält: BSA, Tween, Fluorescein (FITC) markiert antihuman-Antikörper	1 x 4,8 ml	**PC54.100**	ANCA-Muster-Kontrolle C-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA-Muster-Kontrolle P-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	
54.050	**ANCA Ethanol (6 Kavitäten)**	**S54.050**	6	humane Neutrophile (Ethanolfixierung)	10	**C54.050**	**IgG** Blauer Verschluss: leicht bläuliche Lösung. Enthält: BSA, Tween, Fluorescein (FITC) markiert antihuman-Antikörper	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	ANCA-Muster-Kontrolle C-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA-Muster-Kontrolle P-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	
54.051	**ANCA Formalin (6 Kavitäten)**	**S54.051**	6	humane Neutrophile (Formalinfixierung)	10	**C54.051**	**IgG** Blauer Verschluss: leicht bläuliche Lösung. Enthält: BSA, Tween, Fluorescein (FITC) markiert antihuman-Antikörper	1 x 2,4 ml	**PC54.100**	ANCA-Muster-Kontrolle C-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	1 x 0,5 ml
									PC54.101	ANCA-Muster-Kontrolle P-ANCA Roter Verschluss: farblose Lösung. Enthält: Humanserum (verdünnt), Natriumazid <0,1 % (Konservierungsstoff)	

HINWEIS: Der Inhalt der übrigen Bestandteile der Kits, d. h. der gemeinsamen Reagenzien (Negativ-Kontrastmittel, Einbettungsmedium usw.), wird weiter unten in Abschnitt 8 INHALT DER STANDARDREAGENZIEN beschrieben.

8. INHALT DER STANDARDREAGENZIEN

a. Standardreagenzien

Ref.	Reagenz	Menge / Volumen		Beschreibung	Gebrauchsfertige
NCANCA	Negativkontrolle	1x	0,5 ml	Grüner Verschluss: Farblose Lösung. Inhalt: Humanserum (verdünnt), Natriumazid < 0,1 % (Konservierungsstoff)	JA
*** EBIFA**	Evans-Blau 0,2 %	1x	1,5 ml	Weißer Verschluss: Blaue Lösung. Inhalt: PBS, Evans-Blau. Das 0,2 %ige Evans-Blau 1:3000 in 1 x WBIFA verdünnen	NEIN
MMIFA	Mounting-Medium	1x	8 ml	Für die Anwendung mit dem HELMED® validiert Weißer Verschluss: Farblose Lösung. Inhalt: PBS, Glycerin.	JA
WBIFA	Waschpuffer (10x)	1x	100 ml	Weißer Verschluss: Farblose Lösung. Den konzentrierten Puffer 1:10 in destilliertem Wasser (z. B. 100 ml + 900 ml) verdünnen. Inhalt: PBS, Natriumazid (Konservierungsstoff).	NEIN
SBIFA	Probenverdünnungs-puffer	1x	70 ml	Weißer Verschluss: Farblose Lösung. zur Verdünnung der Patientenseren Inhalt: BSA, PBS, Natriumazid (Konservierungsstoff).	JA

Mengenangabe je Kit. (*) müssen separat geordert werden

b. Zusätzlich erforderliches Material

1. Destilliertes Wasser
2. Teströhrchen zur Probenverdünnung
3. Messkolben
4. Volumetrische Pipette
5. Timer
6. Fluoreszenzmikroskop mit FITC-System (Anregungsfilter: 490 nm, Barrierefilter: 510 nm)
7. Inkubationswanne
8. Färbewanne
9. Pipettenspitzen
10. Deckgläser (24 x 60 mm)
11. Spritzflasche

Sollten die Produktinformationen, einschließlich der Produktkennzeichnung, beschädigt oder falsch sein, so wenden Sie sich bitte an den Hersteller bzw. Lieferant des Testkits.

9. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Lagern Sie alle Reagenzien bei 2-8 °C/35,6-46,4 °F. Starke Lichteinwirkung ist zu vermeiden. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum.

Lagern Sie alle Reagenzien und die Objektträger bei 2-8 °C/35,6-46,4 °F in ihren Originalbehältnissen. Rekonstituierte Lösungen sind nach der Zubereitung mindestens 1 Woche bei 2-8 °C/35,6-46,4 °F haltbar.

Die Reagenzien und Objektträger dürfen nur bis zu dem auf den einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

10. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

c. 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

Dieses Kit enthält potenziell gefährliche Komponenten. Auch wenn die Kitreagenzien nicht als reizend für Augen und Haut eingestuft sind, empfiehlt es sich, den Kontakt mit den Augen und der Haut zu vermeiden und Einweghandschuhe zu tragen.

Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs (Kontrollen usw.) erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg), Hepatitis C und HIV als negativ. Kein Test kann jedoch Viren in derartigem Material mit Sicherheit ausschließen. Daher sind die Kontrollen des Kits sowie Patientenproben als potenziell infektiös einzustufen und gemäß nationalen Vorschriften zu handhaben.

Der Testkit enthält Material tierischen Ursprungs (BSA, Immunglobuline) wie in Kap. „Kitbestandteile" aufgeführt, befolgen Sie bei Verwendung die nationale Rechtslage.

d. Allgemeine Hinweise

1. Nicht mit dem Mund pipettieren. Während des Arbeitens mit dem Kit nicht essen, trinken oder rauchen
2. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden, da dies zu Verfälschungen der Messergebnisse führen kann.
3. Nach dem Gebrauch alle Flaschen wieder fest verschließen, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden.
4. Pipettieren Sie immer alle Komponenten mit frischen sterilen Spitzen.
5. Setzen Sie die einzelnen Kit-Komponenten niemals höheren Temperaturen als 37 °C/98,6°F aus (außer MMIFA).
6. Lassen Sie die Objektträger während der gesamten Abarbeitung des Testes niemals austrocknen.
7. Die Objektträger niemals einfrieren!

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

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.

Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, ist der Test ungültig und zu wiederholen. Überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Verfallsdatum der (angesetzten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten und anderes Material zur Abarbeitung, Photometer, Inkubationszeiten und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche Fehler und Abweichungen erkannt haben oder dass die Validationskriterien ohne erkennbaren Grund nicht erreicht werden, setzen Sie sich bitte mit dem Hersteller oder Ihrem Lieferanten in Verbindung.

11. PROBENENTNAHME, VORBEREITUNG UND LAGERUNG

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

Lipämische, ikterische, 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 Trennung sollten die Serumproben innerhalb von 8 Stunden verwendet werden bzw. bei 2-8 °C/35,6-46,4 °F für bis zu 2 Wochen gelagert werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben bei -20 °C/-4 °C tiefgefroren werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

12. TESTDURCHFÜHRUNG

e. Vorbereitung

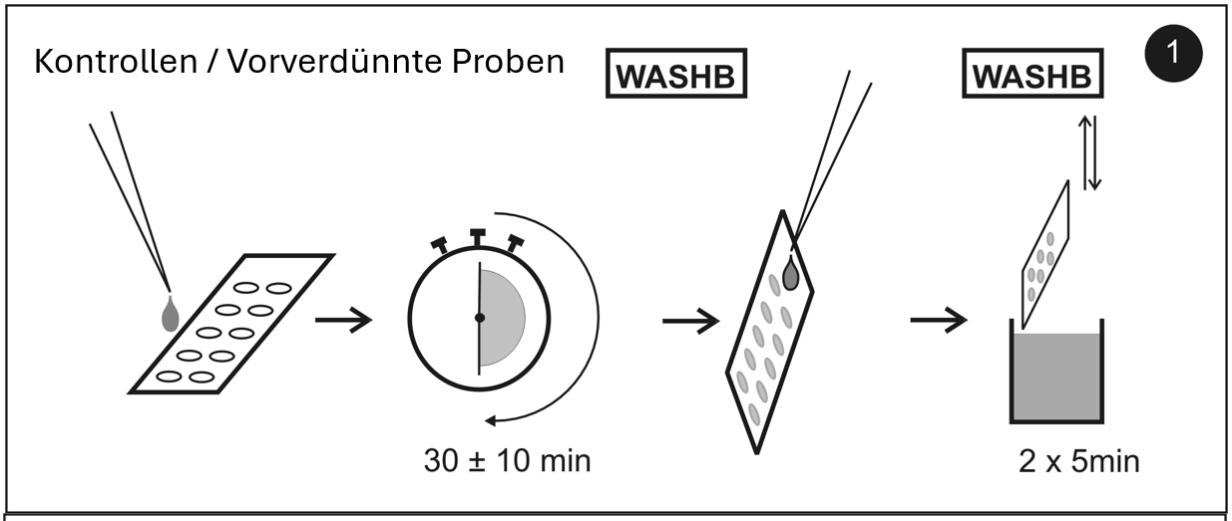
Bringen Sie alle Komponenten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-26 °C/68-78,8 °F) und mischen Sie diese gut. Halten Sie die empfohlenen Inkubationszeiten ein, um ein optimales Testergebnis zu erzielen.

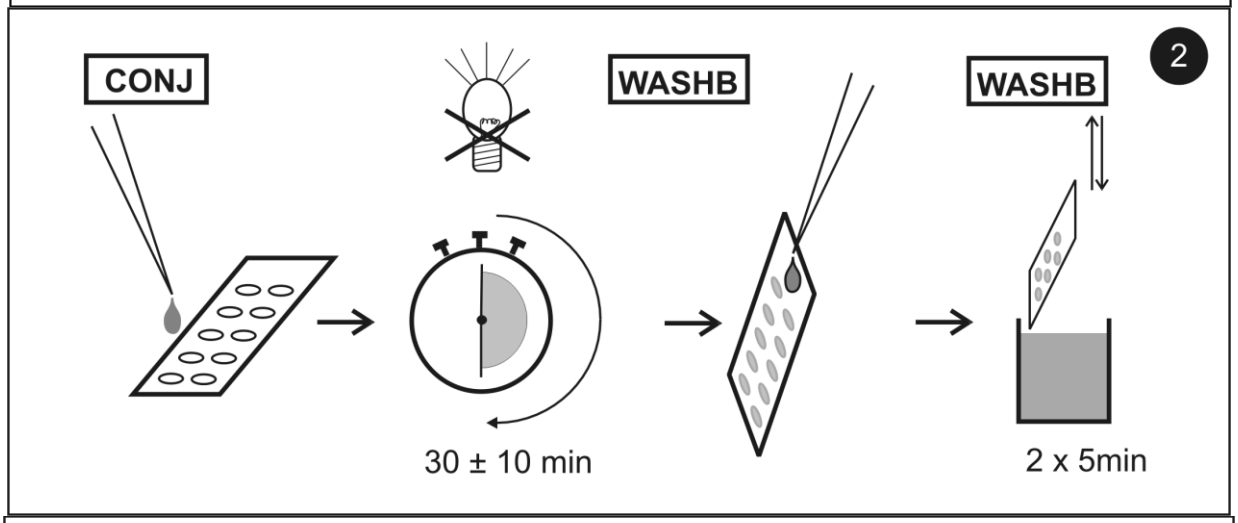
1. Vorbereitung des Waschpuffers: Den konzentrierten Puffer 1:10 in destilliertem Wasser verdünnen.
2. Probenverdünnung: Die Patientenseren mit 1-fach konzentriertem (1x) Probenpuffer verdünnen (für Screening-Titer siehe o.g. Abschnitt ***Anwendung des Kits*** unter Bezugnahme auf die verwendete Produktreferenz). Die Verdünnungen sind je nach Kit zum Nachweis von HEp-2, nDNA, rLKS, EMA, ANCA etc. unterschiedlich.
3. Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.
4. Protokollerstellung: Datenauswertungsbögen befinden sich im Abschnitt ***Anwendung des Kits*** unter Bezugnahme auf die verwendete Produktreferenz.
5. Bei erhöhter Viskosität und/oder Trübung sollte das Mounting Medium (MMIFA) vor der Verwendung 15 Minuten lang in einem Wasserbad auf 56 °C/132,8 °F erwärmt und dann auf Raumtemperatur (20-22 °C/68–71,6 °F) gebracht werden. Nach dieser Prozedur kann das erwärmte Reagenz bis zu 21 Tage in Folge verwendet werden, vorausgesetzt, es wird bei 2-8 °C/35,6-46,4 °F gelagert, wie auf dem Reagenzetikett und in der Gebrauchsanweisung angegeben.

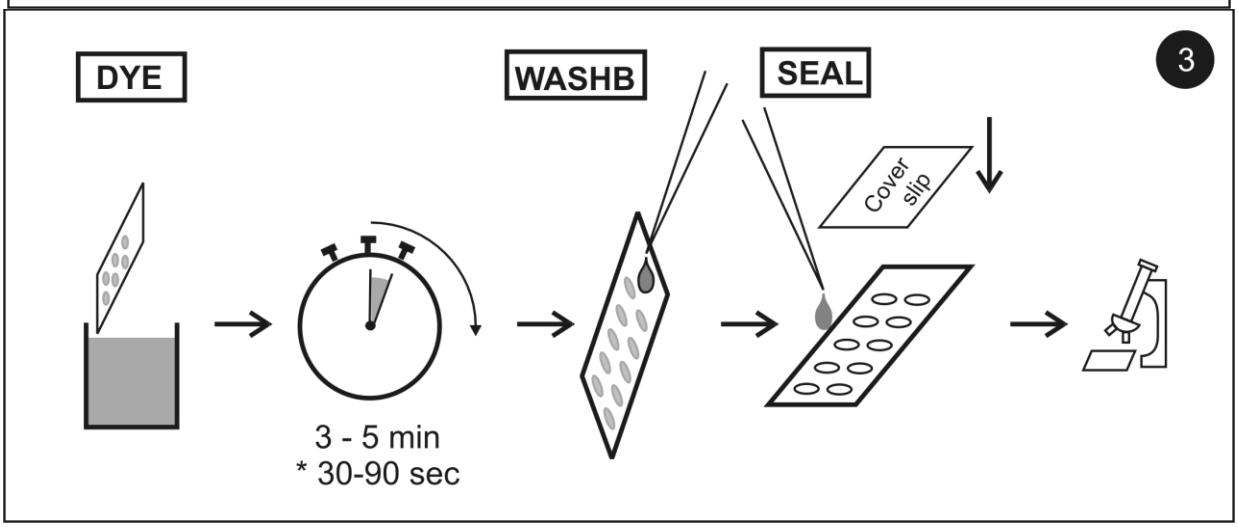
f. Testdurchführung

Nr.	Beschreibung der Schritte
1.	Entfernen Sie die für Ihren Test erforderlichen Objektträger aus der Schutzverpackung und beschriften Sie diese. Vermeiden Sie ein Berühren der beschichteten Gewebe oder Zellen. Den Objektträger niemals austrocknen lassen.
2.	**Vorbereitung der Inkubationsschale:** Platzieren Sie eine kleine Menge deionisiertes oder destilliertes Wasser in der Inkubationswanne und setzen Sie die Objektträger ein. Inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten ± 10 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Inkubationswanne. Benutzen Sie dieselbe Inkubationszeit für das Konjugat **Erste Inkubation:** Pipettieren Sie von jedem zu testendem Patientenserum und den Kontrollen (gebrauchsfertig) eine ausreichende Menge in die entsprechenden Kavitäten. Vermeiden Sie einen direkten Kontakt der Pipettenspitze mit der Objektträgeroberfläche. Stellen Sie sicher, dass jedes Testfeld vollständig mit dem entsprechenden Serum bzw. der Kontrolle benetzt ist. Hierfür ist es wichtig, so viel Testmaterial wie notwendig zu verwenden, ein Ineinanderlaufen der verschiedenen Serumproben ist jedoch zu vermeiden, da dies zu falschen Resultaten führen kann.
3.	**Waschen:** Nach der Inkubation entnehmen Sie die Objektträger aus der Inkubationswanne und spülen diese kurz unter Verwendung einer Spritzflasche mit Waschpuffer ab. Richten Sie den Waschpufferstrom nicht direkt auf die Kavitäten. Achtung: Um Kreuzkontaminationen auf dem Objektträger zu vermeiden, richten Sie bitte den Waschpufferstrom entlang der Mittellinie des Objektträgers und lassen ihn vorsichtig an der unteren Kante ablaufen. Dann kippen Sie den Objektträger und wiederholen den Vorgang für die andere Reihe, auch hier den Washpufferstrom an der nun unteren Kante ablaufen lassen. Waschen Sie anschließend die Objektträger 10 Minuten mit Waschpuffer in einer Färbeküvette. Vermeiden Sie jegliche Berührung des Substrats mit anderen Objekten. Um optimale Resultate zu erzielen ist es erforderlich, den Waschpuffer einmal nach 5 Minuten zu wechseln. Entnehmen Sie die Objektträger aus der Färbeküvette und entfernen Sie vorsichtig einen verbliebenen Überschuss an Waschpuffer. HINWEIS: Achten Sie darauf, dass die Kavitäten während des Verfahrens nicht austrocknen und das Substrat nicht beschädigt wird. Bitte blotten bzw. trocknen Sie den Objektträger keinesfalls. Lassen Sie den Objektträger nicht länger als einige Sekunden ohne Fluoreszenz-Antikörperreagens stehen.
4.	**Zweite Inkubation**: Nach dem Waschen bringen Sie den Objektträger unverzüglich in die feuchte Kammer und bedecken Sie jedes Testfeld mit einer ausreichenden Menge des gebrauchsfertigen FITC markierten Konjugates, so dass das Testfeld vollständig bedeckt ist. Inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten ± 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
5.	**Waschen:** Nach der Inkubation entnehmen Sie den Objektträger aus der Inkubationsschale und spülen Sie ihn kurz mit Waschpuffer ab. Verwenden Sie hierzu eine Spritzflasche. Richten Sie den Waschpufferstrom nicht direkt auf die Gewebeschnitte oder Zellen. Waschen Sie anschließend die Objektträger 10 min mit Waschpuffer in einer Küvette. Um optimale Resultate zu erzielen ist es erforderlich, den Waschpuffer einmal nach 5 Minuten zu wechseln.
6.	***Optionale Gegenfärbung:** Verdünnen Sie das Gegenfärbe-Reagens (Evans Blue) 1:3000 in Waschpuffer und mischen Sie es gut. Füllen Sie das Evans Blue in eine Färbeküvette und inkubieren Sie die Objektträger darin. Siehe o.g. Abschnitt ***Anwendung des Kits*** für die jeweiligen Inkubationszeiten der einzelnen Produktreferenzen. Evans Blue unterdrückt eine unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz. Entnehmen Sie den Objektträger nach der Inkubationszeit und spülen Sie diesen kurz mit Waschpuffer. Entfernen Sie vorsichtig einen verbliebenen Überschuss an Waschpuffer. Bitte blotten Sie die Objektträger nicht auf saugfähiges Papier, ebenso dürfen diese niemals jeglicher Trocknung unterzogen werden.
7.	**Eindecken**: Geben Sie eine ausreichende Menge an Eindeckmedium (Mounting Medium) entlang der Mittellinie auf den Objektträger. Lassen Sie vorsichtig das Deckglas auf das Eindeckmedium gleiten, vermeiden Sie dabei die Bildung von Luftblasen.
8.	**Mikroskopieren**: Mikroskopieren Sie die Objektträger unverzüglich bei 400 bis 800-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (490 nm Anregungsfilter, 510 nm Grenzfilter).

g. Arbeitsablauf







13. FEHLERBEHEBUNG

FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
Geringe Zelldichte	• Zelllyse durch Kontakt mit deionisierten Wasser • Puffer direkt auf die Zellen gespritzt	Halten Sie die angegebenen Waschbedingungen ein
	Proteolytische Enzyme haben die Zellen angegriffen	Inaktivieren Sie das Serum
Ungleichmäßige Fluoreszenz	Serum ist auf den Testfeldern eingetrocknet, Fluoreszenz ist an den Rändern stärker	stets in feuchter Umgebung inkubieren
	Serum bedeckt nicht das Testfeld	Verwenden Sie ein ausreichendes Volumen an Testmaterial
	Kreuzreaktionen zwischen Testfeldern	ein Überlaufen der Proben zwischen den Testfeldern bei der ersten Inkubation vermeiden
	Beschriftung des Objektträgers mit einem Wachsstift erzeugt einen Film	Verwenden Sie einen Bleistift
	Mikroskop falsch justiert	Überprüfen Sie die Justierung
Bild diffus	Objektträger im Kühlschrank ohne Bedeckung gelagert	Versiegeln Sie das Deckglas mit Nagellack oder Paraffinwachs
	I.F. Mikroskop verschmutzt. Mögliche Kratzer auf der Linse	Säubern Sie das Mikroskop entsprechend der Bedienungsanleitung
Geringe oder keine Fluoreszenz	Konjugat und Objektträger eingefroren und wieder aufgetaut	Konjugate und Objektträger bei 2-8 °C / 35,6-46,4 °F lagern.
	Kontrollen wurden verdünnt	Überprüfen Sie die Anleitung, verwenden Sie die gebrauchsfertigen Kontrollen des Kits
	• Bakterielle Kontamination der Seren oder Konjugate • Mikroskop nicht justiert • pH-Wert des Waschpuffers zu niedrig (pH Wert 7,4 ± 0,2)	Bedingungen überprüfen
	FITC Konjugat Licht ausgesetzt	Konjugat unter Vermeidung von Lichteinfall lagern
Background Fluoreszenz	• Falsch gewaschen • Objektträger ist ausgetrocknet • Lipämische, hämolytische Seren • Mikroskop Fehler	• Waschvorgaben überprüfen • Objektträger niemals austrocknen lassen • frische Seren verwenden • Überprüfen Sie die Filter / das Objektiv

14. REGULATORISCHE SYMBOLE

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	