

Verwendungszweck

Der CellTrend anti-Endothelin-Rezeptor A-Antikörper-EIA (ETA-EIA) ermöglicht die Bestimmung von humanen Antikörpern des Typs IgG gegen den Endothelin-Rezeptor Subtyp A im Humanserum und -plasma. Endothelin ist ein Peptidhormon, das seine Wirkung an den glatten Muskelzellen entfaltet. Endothelin vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Endothelinrezeptoren. Derzeit sind zwei Rezeptorsubtypen des Endothelinrezeptors bekannt, die als ET_A und ET_B bezeichnet werden. ET_A-Rezeptoren können unter anderem in glatten Muskelzellen der Blutgefäße gefunden werden, wo sie für die durch Endothelin-1 verursachte Vasokonstriktion verantwortlich sind. ETA spielt eine wichtige Rolle bei der Differentialdiagnostik der Sclerodermie und der pulmonalen arteriellen Hypertonie [1].

Testprinzip

Der ETA-EIA ist ein Antikörper-Suchtest. An der Mikrotiterplatte sind Endothelin-Rezeptoren gebunden. Während der Inkubation werden die in den Proben vorhandenen anti-Endothelin-Rezeptor A-Antikörper an der Platte immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem anti-human-IgG-Sekundärantikörper, der mit Peroxidase markiert ist. In der folgenden enzymatischen Substratreaktion bildet sich ein farbiges Produkt, dessen Farbintensität proportional der Konzentration und/oder Avidität der anti-Endothelin-Rezeptor-Antikörper ist.

Wichtige Hinweise

Testkit bei 2-8 °C lagern (Versand erfolgt bei Umgebungstemperatur).

Nur zur in-vitro Bestimmung.

Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr benutzen. Das Verfalldatum ist auf der Verpackung angegeben.

Vor Gebrauch diese Gebrauchsinformation sorgfältig durchlesen.

Die Testdurchführung muß durch ausgebildetes Fachpersonal erfolgen.

Lipämische, ikterische, hämolytische oder bakteriell verunreinigte Proben können zu unzuverlässigen Testergebnissen führen.

Nur Reagenzien einer Charge verwenden.

Die Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, daher Berührung mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.

Die Standard- und Kontrollmaterialien dieses Tests wurden aus menschlichen Seren hergestellt, die auf Hepatitis B-Oberflächen Antigen (HB_sAg), Anti-HCV- und Anti-HIV 1/2-Antikörper getestet wurden und negativ waren.

Trotzdem sollten alle Reagenzien und Proben als potentiell infektiös angesehen werden. Die Vorsichtsmaßnahmen zum Umgang mit infektiösem Material sind unbedingt einzuhalten.

Die Stopplösung **SOLN STOP** enthält Schwefelsäure. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

Symbols / Symbole / Symbôles / Simbolos / Simbolos / Simboli / Συμβολα

	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.º Cat.: / N.-Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lote N.º: / Lotto n.: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Usar até: / Da utilizzare entro: / Χρησιμοποιείται από:
	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / N.º de Testes: / Quantità dei tests: / Αριθμός εξετάσεων:
	In Vitro Diagnostic Medical Device. / In-vitro-Diagnostikum. / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro. / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro. / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro. / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro. / Ιατρική συσκευή για In-Vitro διάγνωση.
	Read instructions before use. / Arbeitsanleitung lesen. / Lire la fiche technique avant emploi. / Lea las instrucciones antes de usar. / Ler as instruções antes de usar. / Leggere le istruzioni prima dell'uso. / Διαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση.
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazenar a: / Conservare a: / Αποθήκευση στους:
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabbricante: / Παραγωγός:

Literatur

1. Gabriela Riemekasten, Aurélie Philippe, Melanie Näther, et al. *Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis 2011 Mar; 70(3): 530-536

2. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, Hetzer R, Dragun D. *Non-HLA Antibodies Targeting Vascular Receptors Enhance Alloimmune Response and Microvasculopathy After Heart Transplantation*. Transplantation. 2012 Oct 2

Gebrauchsinformation

**EIA zur quantitativen Bestimmung von
humanen anti-Endothelin-Rezeptor A-Antikörpern**

REF 12100



CellTrend GmbH

Im Biotechnologiepark 3
D-14943 Luckenwalde
Tel.: 03371 / 6199 600
FAX: 03371 / 6199 604
Email: info@celltrend.de
www.celltrend.de

Testdurchführung

Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. Eine ausreichende Anzahl Mikrotiter-Module zum Ansatz von Standards, Kontrollen und Proben vorbereiten.
2. Je 100 µl der Serumverdünnungen, der Standardreihe, der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und des Verdünnungspuffers (Leerwert) in die jeweiligen Wells pipettieren.
3. 2 Stunden bei 2-8 °C (Kühlschrank) inkubieren, die Wells dabei mit der Klebefolie abdecken.
4. Die Kavitäten durch Ausschlagen entleeren und 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen, Pufferreste durch Ausschlagen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5. 100 µl der Peroxidasekonjugatlösung in jede Kavität pipettieren.
6. 1 Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt (Folie) mit Schütteln inkubieren.
7. Waschen wie bei 4. beschrieben.
8. Jeweils 100 µl TMB-Substratlösung **SUBS|TMB** in die Kavitäten pipettieren.
9. Die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
10. 100 µl Stopplösung **SOLN|STOP** in jedes Well geben.
11. Messung der optischen Dichte im Photometer bei 450 nm (möglichst Messung mit einer Referenzwellenlänge von 620-690 nm).

Die Färbung der Lösung ist mindestens 30 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

Auswertung

Zur Auswertung dieses Tests ist eine Computer-ELISA-Software zur Kurvenanpassung der Standardpunkte hilfreich. Eine lineare Auftragung der Konzentrationen der Standards (2,5 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 40 U/ml) auf der x-Achse, die lineare Auftragung der Absorption (y-Achse) und eine 4-Parameter-Kurvenanpassung wird empfohlen.

Der Test ist auswertbar, wenn die Positivkontrolle im angegebenen Bereich (siehe Flaschenetikett) und die Negativkontrolle unter dem cut-off Wert (10 U/ml) liegen.

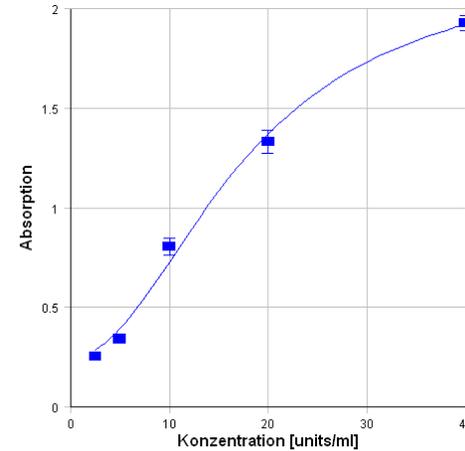
Der ETA-Antikörper-Gehalt der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Proben >17 U/ml sind positiv, Proben 10-17 U/ml sind als erhöhtes Risiko zu bewerten (at risk), Proben <10 U/ml sind negativ. Liegen Messwerte oberhalb der Standardkurve, kann in einer nachfolgenden Bestimmung mit einer höheren Probenverdünnung (z. B. 1:500) ein geeigneter Messwert erzielt werden. Das Resultat in U/ml muß dann mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor (z. B. 5) multipliziert werden.

Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwerte etablieren.

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werten getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Verfahren.

Testcharakteristik

- Typische Standardkurve



Diese Standardkurve ist nur zu Demonstrationszwecken abgebildet und darf nicht zur Auswertung verwendet werden.

- Intraassay-Variationskoeffizient (CV)

(n=10)

Probe 1 (21,4 U/ml): 6,3%

- Interassay-Variationskoeffizient (CV)

(n=20)

Probe 1 (22,9 U/ml): 8,3%

Bestandteile der Testpackung:

			Packungsgröße	1x96 Best.
MTP			Mikrotiter-Module, Endothelin-Rezeptor A beschichtet	12 x 8
BUF	WASH	10x	Waschpuffer, 10fach konz. ©	50 ml
DIL	SPE		Proben-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig ©	50 ml
DIL	CONJ		Konjugat-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig ©	14 ml
CAL	1-5		Standards, gebrauchsfertig [2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 U/ml] ©	1 ml
CONTROL	+		Positivkontrolle, gebrauchsfertig ©	1 ml
CONTROL	-		Negativkontrolle, gebrauchsfertig ©	1 ml
CONJ	ENZ	100x	anti-human-IgG, Peroxidasekonjugat, 100fach konz. ©	0,2 ml
SUBS	TMB		TMB-Substrat, gebrauchsfertig	12 ml
SOLN	STOP		Stopplösung, gebrauchsfertig (0,5 M Schwefelsäure)	12 ml

© : enthält ProClin 300

Kurzanleitung:

A. Vorbereitung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Waschpuffer 1:10 verdünnen
3. Serumproben 1:100 mit Proben-Verdünnungspuffer verdünnen
4. Peroxidasekonjugat frisch 1:100 mit Konjugat-Verdünnungspuffer verdünnen

B. Durchführung

1. Je 100 µl verdünnte Probe/Standard/Negativkontrolle/Positivkontrolle pipettieren
2. 2 h bei 2-8 °C inkubieren
3. 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen
4. Je 100 µl Peroxidasekonjugat pipettieren
5. 1 h bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubieren
6. 3 mal mit je 300 µl Waschpuffer waschen
7. 100 µl Substratlösung pipettieren
8. 20 min bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubieren
9. 100 µl Stopplösung zugeben
10. Absorption bei 450 nm messen

Zusätzlich erforderliche Chemikalien und Geräte

destilliertes oder deionisiertes Wasser
 Meßzylinder
 Mikropipetten (Mehrkanalpipette, Multipipette)
 Wirbelmischer (Vortex)
 Kühlschrank (2-8 °C)
 Schüttler für Mikrotiterplatten
 Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm Wellenlänge

Entsorgung

Die Entsorgung muß entsprechend den örtlichen Vorschriften erfolgen. Mit humanem Material kontaminierte Geräte und Lösungen müssen zur Beseitigung eines potentiellen Infektionsrisikos entsprechend behandelt werden.

Probengewinnung und -lagerung

Serum oder Plasma nach der internen Methode gewinnen.

Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 48 h

Lagerung bei 2-8 °C bis zu 4 Tagen

Langzeitlagerung bis zu 12 Monaten bei - 20 °C. Wiederholtes Einfrieren/Auf-tauen vermeiden.

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

- Vor Testbeginn alle Komponenten auf Raumtemperatur bringen, evtl. auskristallisierte Salze der Pufferkonzentrate in Lösung bringen.

- Die Kavitäten der Mikrotiter-Module [MTP] können durch Abbrechen genau dem Bedarf angepaßt werden. Nicht benutzte Module sind zusammen mit dem Trockenbeutel in der wiederverschließbaren Originalverpackung stets gut verschlossen bei 2-8 °C zu lagern.

- Das Waschpuffer-Konzentrat [BUF | WASH | 10x] ist vor Gebrauch mit destilliertem Wasser **1:10** zu verdünnen (z. B. 50 ml + 450 ml Wasser). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei 2-8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

- Die humanen Serumproben sind **1:100** mit Proben-Verdünnungspuffer [DIL | SPE] zu verdünnen. (z. B. 5 µl Serum + 495 µl Puffer).

- Das Peroxidasekonjugat-Konzentrat [CONJ | ENZ | 100x] ist vor Gebrauch mit Konjugat-Verdünnungspuffer [DIL | CONJ] **1:100** zu verdünnen (z. B. 50 µl + 4950 µl Puffer). Die Konjugatlösung ist stets frisch anzusetzen.

- Die Standards [CAL | 1-5], die Positivkontrolle [CONTROL | +], die Negativkontrolle [CONTROL | -], der Proben-Verdünnungspuffer [DIL | SPE] und der Konjugat-Verdünnungspuffer [DIL | CONJ] sind gebrauchsfertig. Nach Anbruch sind sie bis zum Verfalldatum des Testkits haltbar.