

VERWENDUNGSZWECK

Das Zeus **AtheNA Multi-Lyte**® Autoimmune Vasculitis (AIV) Plus Testsystem ist für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen drei separate Antigene (Glomeruläre Basalmembran - GBM, Myeloperoxidase - MPO und Proteinase 3 - PR-3) im Humanserum bestimmt. Das Testsystem ist für den Gebrauch als Hilfsmittel bei der Diagnose verschiedener autoimmunvaskulitischer Störungen bestimmt, die von erhöhten Spiegelungen ausgewählter Autoantikörper gekennzeichnet sind. MPO und/oder PR-3 können mit Autoimmunstörungen einhergehen wie der Wegener's Granulomatosis, ICGN, MPA und PRS. Anti-GBM-Antikörper unterstützen die Diagnose des Goodpasture-Syndroms. Dieser Test ist nur für *In-vitro*-Diagnosen bestimmt.

BEDEUTUNG UND HINTERGRUND

Der antineutrophile Zytoplasma-Antikörper (ANCA) wurde erstmals 1982 von Davies, u. a. beschrieben (1). Seit dieser erstmaligen Entdeckung wurde herausgefunden, dass der ANCA mit einer Vielzahl von Systemischen Vasculitides (SV) einhergeht. Es wird inzwischen anerkannt, dass der ANCA zwei grundlegende Besonderheiten einschließt: den gegen die PR-3 gerichteten C-ANCA und den gegen die MPO gerichteten P-ANCA. Das Testen auf sowohl den P-ANCA als auch den C-ANCA ist bei der Laborarbeit sehr für Patienten zu empfehlen, die klinische Merkmale aufweisen, welche auf SV hindeuten. Die am häufigsten mit dem ANCA einhergehenden klinischen Syndrome sind folgende: Wegeners Granulomatosis (2), Polyarteritis (3), „Overlap“ Vasculitis (4), Idiopathische Crescentic Glomerulonephritis (ICGN) (5), Kawasaki-Krankheit (6) und renale Autoimmunerkrankungen wie das Goodpasture-Syndrom (7).

Obwohl die anfängliche Identifizierung des C-ANCA und des P-ANCA auf indirekten Immunfluoreszenz-Verfahren basierte, hat die weitere Identifizierung und Purifikation von PR-3 und MPO zur Entwicklung von Enzym-Immunoassays (ELISA) und Microparticle Immunoassays sowohl für PR-3 als auch für MPO geführt. Das Goodpasture-Syndrom ist durch Lungenblutung, Nierenversagen und das Vorhandensein von Anti-GBM-Antikörpern (8) gekennzeichnet. Beim Goodpasture-Syndrom ist ein Teil der globularen Domäne der Ketten von Kollagen IV antigenisch und verantwortlich für die Bildung von Anti-GBM-Antikörpern bei progressiver Glomerulonephritis (9, 10 und 11).

PRINZIP DES TESTS

Das ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystem ist für den Nachweis von Antikörpern der IgG-Klasse gegen MPO, PR-3 und GBM in Humanseren bestimmt. Das Testverfahren umfasst zwei Inkubationsschritte:

- Die (ordnungsgemäß verdünnten) Testseren werden in einem Gefäß, das eine Multiplex-Mischung der Bead-Suspension enthält, inkubiert. Die Bead-Suspension enthält eine Mischung aus unterscheidbaren Sets von Polystyrol-Mikrosphären (Kügelchen oder Beads); jedes Set mit einem anderen Antigen konjugiert. Wenn bestimmte Antikörper in den Seren des Patienten vorkommen, werden diese bei einem oder mehreren Bead-Sets an das immobilisierte Antigen gebunden. Die Beads werden gespült, um nicht-reaktive Serumproteine zu entfernen.
- Phycoerythrin-konjugiertes Ziegen-Anti-Human-IgG wird in das Gefäß hinzu gegeben, und die Platte wird inkubiert. Die Konjugierung reagiert mit dem in der festen Phase in Schritt 1 immobilisierten IgG-Antikörper. Dann wird die Beadsuspension mit dem AtheNA Multi-Lyte Instrument analysiert. Das/die Bead-Set(s) wird/werden klassifiziert (identifiziert), und die Reportertermolekülmenge (PE-Konjugat) wird für jedes Bead-Set bestimmt. Unter Verwendung der *Intra-Well Calibration Technology*® werden die inneren Kalibrations-Bead-Sets verwendet, um die Roh-Fluoreszenz in Ergebnisse (Einheiten) umzuwandeln.

KOMPONENTEN DES TESTSYSTEMS

Gelieferte Materialien:

Jedes Testsystem enthält die folgenden Komponenten in ausreichenden Mengen, um die auf der Verpackung angegebene Anzahl von Tests durchzuführen. **HINWEIS: Folgende Komponenten enthalten <0,1 % (Gtrmm-Vol.-%) Natriumazid als Konservierungsmittel: Bead-Suspension, Kontrollen, Konjugat und SAVE Diluent®.**

SOLN	BEAD	
		1. Bead-Suspension: Enthält separate unterscheidbare 5,6 Mikron Polystyrol-Beads, die mit den folgenden Antigenen konjugiert sind: Myeloperoxidase (MPO), Proteinase 3 (PR-3) und Glomeruläre Basalmembran (GBM). Die Bead-Suspension enthält ebenfalls ein Bead-Set, das zum Nachweis von nicht-spezifischen Antikörpern in der Patientenprobe (falls vorhanden) bestimmt ist, sowie vier getrennte Bead-Sets, die für die Test-Kalibration verwendet werden. Eine gelbe Flasche mit 5,5 ml Inhalt. Gebrauchsfertig.
		2. Konjugat: Phycoerythrin-konjugiertes Ziegen-Anti-Human-IgG (γ-kettenspezifisch). Eine gelbe Flasche mit 15 ml Inhalt. Gebrauchsfertig.
		3. Positiv-Kontrollflüssigkeit 1 (humanes Serum): Eine Ampulle mit roter Verschlusskappe und 0,2 ml Inhalt.
		4. Positiv-Kontrollflüssigkeit 2 (humanes Serum): Eine Ampulle mit weißer Verschlusskappe und 0,2 ml Inhalt.
		5. Negativ-Kontrollflüssigkeit (humanes Serum): Eine Ampulle mit grüner Verschlusskappe und 0,2 ml Inhalt.
		6. SAVE Diluent®: Eine Flasche mit grüner Verschlusskappe mit 50 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Gebrauchsfertig. HINWEIS: Das SAVE Diluent® ändert beim Mischen mit Serum seine Farbe.
		7. Waschpuffer-Konzentrat (10X): Verdünnung: 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser. Eine Flasche mit durchsichtiger Verschlusskappe mit 50 ml der 10-fach konzentrierten Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung.

HINWEISE:

- Die folgenden Komponenten sind nicht abhängig von der Testsystem-Chargennummer und können alle mit dem ZEUS AtheNA Multi-Lyte Testsystem eingesetzt werden: Waschpuffer und SAVE Diluent®.
- Das Testsystem enthält außerdem:
 - Komponentendatenetikett mit chargenspezifischen Informationen im Testsystem-Karton.
 - Kalibrations-CD mit chargenspezifischen Kit-Kalibrationswerten, die für die Probenanalyse und die Test-Qualitätskontrolle erforderlich sind, sowie Packungsbeilage.
 - Eine 96-Mulden Verdünnungsplatte.
 - Eine 96-Mulden Filtrationsplatte.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zum Gebrauch bei der *In-vitro* Diagnostik.
- Bei der Handhabung von Laborreagenzien normale Vorsichtsmaßnahmen einhalten. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Ordnungsgemäße Schutzkleidung, Schutzhandschuhe sowie Augen-/Gesichtsschutz tragen. Dämpfe nicht einatmen. Entsorgung der Abfälle unter Einhaltung aller örtlichen, Landes- und Bundesgesetze.
- Die **AtheNA Multi-Lyte** Bead-Suspension enthält keine lebensfähigen Organismen. Trotzdem sollte das Reagenz als **potentieller biologischer Gefahrenstoff** angesehen und entsprechend gehandhabt werden.
- Die Kontrollflüssigkeiten sind **potenzielle biologische Gefahrenstoffe**. Die Quellenmaterialien dieser Produkte wurden mit anerkannten Testmethoden negativ auf HIV-1-Antigen, HBsAg und auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet. Keine Testmethode kann jedoch eine komplette Gewähr dafür liefern, dass keine infektiösen Agenten vorhanden sind, und deshalb sind diese Produkte gemäß Biosicherheitsstufe 2 zu behandeln, wie für alle potenziell infektiösen humanen

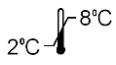
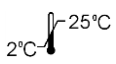
Serum- oder Blutproben im Handbuch „Biosafety in Microbiological und Biomedical Laboratories“ der Centers for Disease Control/National Institutes of Health in der aktuellen Ausgabe sowie dem „Standard for Bloodborne Pathogens“ von OSHA (20) empfohlen.

5. Einhalten der angegebenen Inkubationszeit und Temperatur ist entscheidend für richtige Ergebnisse. **Bevor mit dem Test begonnen wird, müssen alle Reagenzien Raumtemperatur (20 - 25 °C) erreicht haben.** Bewahren Sie nicht benutzte Reagenzien unverzüglich nach Gebrauch wieder an einem gekühlten Aufbewahrungsort auf.
6. Unsachgemäßes Waschen kann falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse erzeugen. Sicherstellen, dass Waschmittelreste auf ein Minimum reduziert werden (z.B. durch Trocknen mit Papier oder Aspiration), bevor Konjugat zugefügt wird. Die Mulden zwischen den Inkubationen nicht austrocknen lassen.
7. Das SAve Diluent®, die Bead-Suspension, die Kontrollen und das Konjugat enthalten Natriumazid in einer Konzentration von <0,1 % (w/v). Natriumazid bildet Blei- und Kupferazide in Laborabflussrohren, die bei Rohrleitungsschlägen Explosionen verursachen können. Waschbecken nach dem Ausgießen von natriumazidhaltigen Lösungen gründlich ausspülen, um Explosionen zu verhindern.
8. Das Waschpufferkonzentrat ist ein REIZMITTEL. Es wirkt reizend auf Augen, Atmungssystem und Haut.
9. Verdünnung oder Verpanschung der Reagenzien kann falsche Ergebnisse erzeugen.
10. Keine Reagenzien aus anderen Quellen oder von anderen Herstellern verwenden.
11. Niemals mit dem Mund pipettieren. Kontakt der Reagenzien und Patientenproben mit der Haut und den Schleimhäuten vermeiden.
12. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden. Es kann zu fehlerhaften Ergebnissen kommen.
13. Querkontamination von Reagenzien und/oder Proben kann fehlerhafte Ergebnisse erzeugen.
14. Spritzen oder Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
15. Reagenzien während der Lagerung oder bei der Inkubation keinem starken Licht aussetzen. Die Bead-Suspension und das Konjugat sind lichtempfindliche Reagenzien. Beide wurden in Lichtschutzbehältern verpackt. Eine normale Exposition, die während der Durchführung des Tests erfolgt, beeinflusst das Testergebnis nicht. Diese Reagenzien nicht unnötig starken Quellen sichtbaren Lichts aussetzen.
16. Die Waschlösung in einem Entsorgungsbassin sammeln. Die verbrauchte Lösung mit einem Desinfektionsmittel behandeln (z. B. 10 %iges Haushaltsbleichmittel - 0,5 % Natriumhypochlorit). Es ist zu vermeiden, die Reagenzien bleichenden Dämpfen auszusetzen.
17. Vorsicht: Flüssigkeitsabfälle mit saurem pH vor Zufügen in die Bleichlösung neutralisieren.
18. Konjugat nicht mit Behältern oder Instrumenten in Kontakt kommen lassen, die vorher eine Lösung mit Natriumazid als Konservierungsmittel enthalten haben könnten. Rückstände von Natriumazid können die Enzymaktivität des Konjugats unterbinden.
19. Keines der reaktiven Reagenzien bleichmittelhaltigen Lösungen oder strengen Gerüchen von bleichmittelhaltigen Lösungen aussetzen. Spuren von Bleichmittel (Natriumhypochlorit) können die biologische Aktivität vieler reaktiver Reagenzien in diesem Testsystem unterbinden.

NICHT ENTHALTENE NOTWENDIGE MATERIALIEN

1. Pipetten mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 10 bis 200 µl.
2. Multikanal-Pipette mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 10 bis 200 µl.
3. Reagenzreservoirs für Multikanal-Pipetten.
4. Serologische Pipetten.
5. Einweg-Pipettenspitzen.
6. Papierhandtücher.
7. Labor-Stoppuhr zur Überwachung der Inkubationsschritte.
8. Entsorgungsbassin und Desinfektionsmittel (z. B. 10 %iges Haushaltsbleichmittel - 0,5 % Natriumhypochlorit).
9. **AtheNA Multi-Lyte System** (Luminex® Instrument) mit Sheath Fluid (Produktnummer 40-50000).
10. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
11. Vortexmischer.
12. Kleiner Badsonikator.
13. Plattenschüttler zum Betrieb bei einer Geschwindigkeit von 800 UPM (optional für Mischvorgang).
14. Vakuum-Sauger und Vakuum-Röhrenkollektor zum Waschen der Mikrosphären.

AUFBEWAHRUNG

	Bead-Suspension: Zur Analyse der zu testenden Präparate nur die benötigte Menge der Lösung entnehmen, und den unbenutzten Teil wieder an den Aufbewahrungsort bringen.
	Konjugat: NICHT EINFRIEREN.
	Ungeöffnetes Testsystem, Positivkontrollen, Negativkontrolle, SAve Diluent®
	Waschpuffer (1X): 20 - 25°C bis zu 7 Tage, 30 Tage zwischen 2 - 8°C.
	Waschpuffer (10X): 2 - 25°C

PROBENAHME

1. Es wird von ZEUS Scientific empfohlen, dass die Probenahme durch den Benutzer in Übereinstimmung mit dem aktuellen CLSI-Dokument M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (aktuelle Ausgabe) erfolgt.
2. Keine bekannte Testmethode kann vollständige Sicherheit geben, dass durch humane Blutproben keine Infektionen übertragen werden. Deshalb müssen alle Blutderivate als potenziell infektiös behandelt werden.
3. Für diesen Test nur frisch entnommene und richtig gekühlte Sera verwenden, die mit zugelassenen aseptischen Venenpunkturnverfahren gewonnen wurden (13, 14). Nicht verwenden, wenn Antikoagulanzen oder Konservierungsmittel zugefügt sind. Verwendung von hämolysierten, lipemischen oder bakteriell kontaminierten Sera vermeiden.
4. Bewahren Sie die Probe bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden auf. Erfolgt der Test nicht innerhalb von 8 Stunden, können Sera zwischen 2 und 8 °C bis zu 48 Stunden lang aufbewahrt werden. Wird eine noch längere Testverzögerung vorausgesehen, Testsera bei -20 °C oder darunter aufbewahren. Mehrfaches Einfrieren/Auftauen vermeiden. Das kann zum Verlust der Antikörper-Aktivität führen und fehlerhafte Ergebnisse bewirken. Jedes individuelle Labor ist dafür verantwortlich, alle verfügbaren Referenzen und/oder eigenen Studien zur Bestimmung seiner laboreigenen Stabilitätskriterien heranzuziehen (15).

TESTVERFAHREN

1. Die verschiedenen Komponenten aus der Aufbewahrung holen und auf Zimmertemperatur (20–25 °C) erwärmen lassen.
2. Gesamtanzahl der zu testenden Kontrollen und Proben bestimmen. Es ist erforderlich, bei jedem Durchlauf die Negativkontrolle und die drei Positivkontrollen durchzuführen. Die Negativkontrolle ist in Mulde A1, die Positivkontrolle 1 in Mulde B1 und die Positivkontrolle 2 in Mulde C1 zu testen. Für jede Kontrolle und Probe wird zur Bearbeitung eine Mikro-Mulde benötigt.
 - a. Zur Optimierung der Lesezeiten muss die Bead-Suspension direkt vor Gebrauch gründlich gemischt werden. Die effektivste Möglichkeit zur Resuspension ist es, die Suspension zuerst ca. 30 Sekunden lang im Vortex-Mischer zu schütteln und sie dann ca. 30 Sekunden lang einer Sonikation in einem kleinen Badsonikator zu unterziehen.

- b. Für ein genaues Testergebnis ist es wichtig, die Inhaltsstoffe des Tests gründlich zu mischen. Zu einer geeigneten Mischmethode gehört das Mischen der Platte auf einem Plattenschüttler für etwa 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von etwa 800 UPM oder die Einführung eines Pipettierers zu ungefähr ½ des auf der Platte befindlichen Volumens und wiederholtes Ansaugen und Ausstoßen (Ein- und Auspumpen) des Muldeninhalts mindestens je 5 Mal.

BEISPIEL PLATTENEINSTELLUNG		
	1	2
A	Negativkontrolle	usw.
B	Positivkontrolle 1	
C	Positivkontrolle 2	
D	Patient 1	
E	Patient 2	
F	Patient 3	
G	Patient 4	
H	Patient 5	

- Herstellung einer 1:21 Verdünnung (z. B. 10 µL Serum + 200 µL SAVE Diluent®) von Negativkontrolle, Positivkontrolle und jedem Patientenserum. **HINWEIS: Das SAVE Diluent® zeigt eine Farbänderung, wodurch bestätigt wird, dass die Probe mit dem Verdünnungsmittel kombiniert worden ist.** Für ein genaues Testergebnis ist es wichtig, die Probenverdünnungen gründlich gemäß 2b oben zu mischen.
- Nach Festlegung der Gesamtzahl der zu bearbeitenden Mulden, verwenden Sie eine Multikanal- oder eine Wiederholpipette, um 50 µL der Bead-Suspension in jede der Mulden der Filtrationsplatte zu geben.
- Übertragen Sie 10 µL jeder verdünnten Probe (1:21) und Kontrolle von der Verdünnungsplatte auf die Filtrationsplatte. Für ein genaues Testergebnis ist es wichtig, die Probenverdünnung und die Bead-Suspension gründlich gemäß 2b oben zu mischen.
- Platte bei Zimmertemperatur (20-25 °C) 30 ± 10 Minuten lang inkubieren.
- Nach der Inkubation die Beads durch Vakuumfiltration unter Verwendung des mitgelieferten Waschpuffers spülen. Der Waschpuffer muss dafür auf 1-fache Konzentration verdünnt werden.
 - Filtrationsplatte auf den Vakuum-Röhrenkollektor aufsetzen, und die Lösung unter Zurücklassen der Beads entfernen.
 - Vakuum abstellen und 200 µL des 1-fach konzentrierten Waschpuffers hinzufügen.
 - Stellen Sie das Vakuum ein und entfernen Sie die Lösung.
 - Schritte 7b und 7c insgesamt dreimal wiederholen, um dreimal zu spülen.
- Nach der letzten Wäsche den Boden der Filterplatte leicht abtupfen und die Platte 3 bis 5 Minuten lang an der Luft trocknen lassen, bevor zum nächsten Schritt übergegangen wird.
- 150 µL Konjugat in jede Mulde hinzufügen, und zwar genauso schnell und in derselben Reihenfolge wie die Proben. Für ein genaues Testergebnis ist es wichtig, das Konjugat und die Bead-Suspension gründlich gemäß 2b oben zu mischen. Als Alternative kann während des Mischens des Konjugats die Mischung in leere Mulden einer Polystyrol-Reaktionsplatte übertragen werden.
- Platte bei Zimmertemperatur (20-25 °C) 30 ± 10 Minuten lang inkubieren.
- Das **AtheNA Multi-Lyte** Instrument für die Analyse der Reaktionen einstellen, indem Sie die AIV Plus Schablone ausgewählt wird. Einzelheiten bezüglich der Benutzung des **AtheNA Multi-Lyte** Instruments sind im Bedienungshandbuch zu finden. Die Ergebnisse können von der Filterplatte oder einer Reaktionsplatte abgelesen werden. **HINWEIS: Für eine genaue Analyse der Probe ist es wichtig, dass das Instrument gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgebaut, kalibriert und gewartet wird.** Bevor die Testergebnisse abgelesen werden, bitte im Handbuch des Instruments die Anweisungen zur Vorbereitung des Instruments lesen.
- Das Ablesen von der Platte sollte innerhalb von 60 Minuten nach Beendigung der Konjugat-Inkubation erfolgen. Die Platte kann vor dem Ablesen nach freier Entscheidung etwa 15 Sekunden lang geschüttelt werden. Dieser optionale Schritt reduziert möglicherweise den zum Ablesen der Platte erforderlichen Zeitaufwand.

Schritt	Kurze Beschreibung des Testverfahrens
1	Verdünnen der Proben 1:21 in SAVE Diluent®. Gut mischen.
2	50 µL der Bead-Suspension und 10 µL der verdünnten Probe zusammen in eine leere Mulde geben. Gut mischen.
3	Bei Zimmertemperatur 30 ± 10 Minuten lang inkubieren.
4	Mikrosphären dreimal mit 200 µL des 1-fach konzentrierten Waschpuffers spülen.
5	Boden der Platte leicht abtupfen und 3 – 5 Minuten an der Luft trocknen lassen.
6	150 µL des Konjugats in jede Mulde hinzugeben. Gut mischen.
7	Auf eine Reaktionsplatte übertragen (optional).
8	Bei Zimmertemperatur 30 ± 10 Minuten lang inkubieren.
9	Platte schütteln (optional).
10	Ergebnisse innerhalb von 60 Minuten ablesen.

QUALITÄTSSICHERUNG

- Bei jeder Durchführung des Tests ist es notwendig, die Negativkontrolle (in Mulde A1) und die zwei Positivkontrollen (in Mulden B1 und C1) durchzuführen.
- Die Aussagekraft des Durchlaufs hängt von der Durchführung der Positiv- und Negativkontrollen ab. Diese Kriterien werden automatisch durch die *Intra-Well Calibration Technology* analysiert.
 - Die Negativkontrolle und die zwei Positivkontrollen müssen alle negativ auf dem nicht-spezifischen oder Kontroll-Antigen-Bead sein.
 - Die Negativkontrolle muss negativ für jeden einzelnen in der Bead-Suspension enthaltenen Analyten ausfallen.
 - Jede Positivkontrolle muss positiv für eine vorbestimmte, in der Bead-Suspension enthaltene Analytengruppe ausfallen. Diese Spannweiten sind innerhalb der Kalibrations-CD kodiert.
 - Sollte irgendeines der oben genannten Kriterien nicht zutreffen, wird der gesamte Durchlauf als ungültig angesehen und muss wiederholt werden.
- Die Aussagekraft der Proben basiert auf den Merkmale der Kalibrations-Beads und ihrer Wechselwirkungen mit den Patientenseren. Verschiedene Parameter werden automatisch durch die *Intra-Well Calibration Technology* überwacht. Sollte sich herausstellen, dass irgendeines der Kriterien außerhalb der Spezifikation liegt, werden die Patientenergebnisse als ungültig angesehen und müssen wiederholt werden. In einem solchen Fall wird im Datenbericht die entsprechende, ungültig gemachte Probe sowie ein Fehler-Code angegeben.
- Zusätzliche Testkontrollen können in Übereinstimmung mit Richtlinien oder Vorschriften von örtlichen oder staatlichen Stellen oder anerkannten Organisationen durchgeführt werden. Externe Kontrollen müssen repräsentativ sein für normales Humanserum, da das **AtheNA Multi-Lyte** Kalibrationssystem teilweise auf den Merkmalen der Serumprobe basiert. Wenn die Formulierung der Probe künstlich ist (kein Humanserum), können fehlerhafte Ergebnisse auftreten.
- Details sind im CLSI-Dokument C24 zu finden: Quality Control for Quantitative Measurements als Leitfaden zu ordnungsgemäßen Qualitätssicherungspraktiken.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Berechnungen**
 - Test-Kalibration: Beim **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystem wird die *Intra-Well Calibration Technology* verwendet. Die *Intra-Well Calibration*

Technology beinhaltet eine Mehrpunkt-Standardkurve innerhalb der Bead-Suspension. Mit der *Intra-Well Calibration Technology* wird jede Mulde des Tests ohne Eingreifen des Benutzers intern kalibriert. Die Standardkurve ist so gestaltet, dass sie sich auf der Grundlage der einmaligen Merkmale des Patienten- oder Kontrollserums selbst anpasst. Kalibrierwerte werden den internen Standards von ZEUS zugewiesen, sind chargenspezifisch und innerhalb der chargenspezifischen Kalibrations-CD kodiert.

- b. Cutoff-Werte der Analyten: Jeder Analyt des ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystems hat einen zugewiesenen Cutoff-Wert. Cutoff-Werte werden von ZEUS für jede Testsystem-Charge bestimmt und innerhalb der chargenspezifischen Kalibrations-CD kodiert.
- c. Durch die *Intra-Well Calibration Technology* werden alle Berechnungen während der Verwendung des AtheNA Multi-Lyte Systems automatisch durchgeführt. Die *Intra-Well Calibration Technology* führt eine Regressionsanalyse der internen Standards aus und gleicht dann die berechneten Einheitswerte auf der Grundlage eines zusätzlichen Standards und der Merkmale der Serumprobe an.

2. **Auswertungen:** Proben -Einheitswerte für GBM, MPO und PR-3 werden wie folgt interpretiert:

Negative Proben	< 100 AU/ml
Positive Proben	> 120 AU/ml
Mehrdeutige Proben	100 – 120 AU/ml

GRENZEN DES TESTVERFAHRENS

1. Das Zeus **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystem ist eine Diagnosehilfe und nicht selbstständig diagnostisch. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit der klinischen Bewertung und den Ergebnissen anderer Diagnoseverfahren interpretiert werden.
2. Hämolytierte, ikterische oder lipemische Proben können die Ergebnisse dieses Tests beeinträchtigen. Zusätzliche Proben mit abnormen IgG-Konzentrationen können die Ergebnisse dieses Tests beeinträchtigen. Die Verwendung derartiger Proben sollte vermieden werden.

ERWARTETE ERGEBNISSE (REFERENZWERTE)

1. **MPO/PR-3**

Die klinische Untersuchung umfasste 122 Proben, die für routinemäßige ANCA-Tests ins Labor geschickt wurden, 173 Proben von klinisch diagnostizierten Patienten sowie 150 Proben von normalen Blutspendern. Die Ergebnisse der MPO- und PR-3 ELISA wurden verwendet, um die erwartungsgemäßen Ergebnisse für derartige Gruppen darzustellen. Die Ergebnisse aller Probengruppen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 unten dargestellt:

Tabelle 1: Erwartete Ergebnisse der MPO und PR-3 Analyten unter Verwendung unterschiedlicher Probengruppen

Gruppe	N	Analyt	AtheNA Multi-Lyte Ergebnis				
			Ungültig	Mehrdeutig	Positiv	Negativ	
Routine	122	MPO	Quantität	2	2	21	97
			%	1,6	1,6	17,2	79,5
		PR-3	Quantität	2	2	50	68
			%	1,6	1,6	41,0	55,7
Klinisch	173	MPO	Quantität	1	2	104	66
			%	0,6	1,2	60,1	38,2
		PR-3	Quantität	1	6	104	62
			%	0,6	3,5	60,1	35,8
Normal	150	MPO	Quantität	0	1	9	140
			%	0,0	0,7	6,0	93,3
		PR-3	Quantität	0	6	27	117
			%	0,0	4,0	18,0	78,0

Tabelle 2: Erwartete Ergebnisse der MPO und PR-3 Analyten unter Verwendung unterschiedlicher Probengruppen

Gruppe	Analyt	AtheNA Multi-Lyte Ergebnis			
		Durchschnittliches Ergebnis	Mittleres Ergebnis	Bereich	
				Niedriger Wert	Hohes Ergebnis
Routine	MPO	211,6	35,5	0	1887
	PR-3	396,3	73	5	3405
Klinisch	MPO	272	50	14	2451
	PR-3	267,2	62	18	3041
Normal	MPO	53	35	0	684
	PR-3	128	57	0	1636

2. **GBM**

Die klinische Untersuchung umfasste 115 Proben, die für ANCA-Tests (Systemische Vaskulitis) ins Labor geschickt wurden und 115 Proben, die für GBM-Tests (Goodpasture-Syndrom) eingereicht wurden. Die erhaltenen Daten wurden verwendet, um die erwartungsgemäßen Ergebnisse für derartige Gruppen darzustellen.

Tabelle 3: Erwartete Ergebnisse der ANCA- und GBM-Analyten unter Verwendung unterschiedlicher Probengruppen

N	Analyt	AtheNA Multi-Lyte Ergebnis				
		Ungültig	Mehrdeutig	Positiv	Negativ	
115	ANCA	Quantität	0	0	20	95
		%	1,6	1,6	17,4	82,6
	GBM	Quantität	0	0	13	102
		%	0,00	0,00	11,3	88,7

Tabelle 4: Erwartete Ergebnisse der ANCA- und GBM-Analyten unter Verwendung unterschiedlicher Probengruppen

Analyt	Durchschnittliches Ergebnis	Mittleres Ergebnis	AtheNA Multi-Lyte Ergebnis	
			Bereich	
			Niedriger Wert	Hohes Ergebnis
ANCA	105	26	2	1180
GBM	85	39	13	1336

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

1. Vergleichsstudie

Zum Nachweis der Gleichwertigkeit des Zeus **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystems verglichen mit auf dem Markt erhältlichen ELISA Testsystemen wurde eine interne Vergleichsstudie durchgeführt. Die Leistung wurde unter Verwendung von 445 Proben bewertet: 150 normale Spenderseren, 122 Proben für routinemäßige ANCA-Auto-Antikörper-Tests ins Labor geschickt worden waren, und 173 Krankheitsproben von klinisch diagnostizierten Patienten mit SV-Störungen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabellen 5 und 6 unten zusammengefasst. Vergleichsdaten für GBM, die durch Verwendung von 230 Proben (einschließlich 115 Seren von Patienten mit Verdacht auf Goodpasture-Syndrom) erlangt wurden, sind in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 5: Leistung des ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus Testsystems (MPO Analyt) verglichen mit dem ZEUS ELISA MPO IgG Testsystem

		ELISA Ergebnisse			
		Positiv	Negativ	Mehrdeutig*	Gesamt
AtheNA Multi-Lyte Ergebnisse	Positiv	55	39	2	96
	Negativ	2	338	1	341
	Mehrdeutig*	1	4	0	5
	Gesamt	59	383	3	445
Relative Sensitivität = 55/57 = 96,5 %		Relative Spezifizität = 338/377 = 89,6 %		Relative Übereinstimmung = 393/434 = 90,6 %	
*Mehrdeutige Proben wurden bei Übereinstimmungsberechnungen ausgeschlossen.					

Tabelle 6: Leistung des ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus Testsystems (PR-3 Analyt) verglichen mit dem ZEUS ELISA PR-3 IgG Testsystem

		ELISA Ergebnisse			
		Positiv	Negativ	Mehrdeutig*	Gesamt
AtheNA Multi-Lyte Ergebnisse	Positiv	85	53	1	139
	Negativ	6	283	0	289
	Mehrdeutig*	4	10	0	14
	Gesamt	96	348	1	445
Relative Sensitivität = 85/91 = 93,4%		Relative Spezifizität = 283/336 = 84,2%		Relative Übereinstimmung = 368/427 = 86,2%	
*Mehrdeutige Proben wurden bei Übereinstimmungsberechnungen ausgeschlossen.					

Tabelle 7: Leistung des ZEUS AtheNA Multi-Lyte AIV Plus Testsystems (GBM Analyt) verglichen mit dem ZEUS ELISA ANCA Testsystem

		ELISA Ergebnisse			
		Positiv	Negativ	Mehrdeutig*	Gesamt
AtheNA Multi-Lyte Ergebnisse	Positiv	31	2	0	33
	Negativ	1	195	1	197
	Mehrdeutig*	0	0	0	0
	Gesamt	32	197	1	230
Positive Prozentuale Übereinstimmung = 31/33 = 93,9 %		Negative Prozentuale Übereinstimmung = 195/197 = 99,0 %		Gesamte Prozentuale Übereinstimmung = 226/230 = 98,3 %	
*Mehrdeutige Proben wurden bei Übereinstimmungsberechnungen ausgeschlossen.					

Tabelle 8: Zusammenfassung der vergleichbaren Leistung

Analyt	N	Relative Sensitivität	Relative Spezifizität	Gesamte Übereinstimmung
MPO	445	55/57 = 96,5 %	338/377 = 89,6 %	393/439 = 90,6 %
PR-3	445	85/91 = 93,4 %	283/336 = 84,2 %	368/427 = 86,2 %
GBM	230	31/33 = 93,9 %	195/197 = 99,0 %	226/230 = 98,3 %

2. Reproduzierbarkeit

Es wurde eine interne Bewertung sowohl der Intra-Test- als auch der Inter-Test-Reproduzierbarkeit vorgenommen. Es wurden sechs Proben getestet. An jedem Testtag wurde jede Probe zweimal verdünnt und dann für vier Replikate geladen, so dass insgesamt acht Mulden mit jeder der sechs Proben bestückt wurden. Dieses Protokoll wurde drei Tage lang durchgeführt. Dann wurden diese Ergebnisse verwendet, um durchschnittliche AU/ml Werte, Standardabweichungen und % CV zu berechnen. Die Proben wurden so ausgewählt, dass die Ergebnisse der Proben 5 und 6 eindeutig negativ, der Proben 1 und 2 eindeutig positiv und der Proben 3 und 4 in der Nähe der Cutoff-Werte des Tests waren. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabellen 9, 10 und 11 unten zusammengefasst:

Tabelle 9: MPO Präzisions-Studie

Probe	Ergebnisse Tag 1		Ergebnisse Tag 2		Ergebnisse Tag 3		Intra-Test-Präzision				Inter-Test-Präzision	
	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2		Tag 1	Tag 2	Tag 3		
1	1350	1275	1905	1642	1478	1619	Durchschnitt	1349	1684	1683	Durchschnitt	1572
	1339	1453	1623	1623	1759	1655	StD	61,94	115,78	99,70	StD	184,98
	1298	1297	1817	1682	1778	1712	% CV	4,6	6,9	5,9	% CV	11,8
	1420	1360	1611	1571	1695	1766						
2	461	458	380	479	503	389	Durchschnitt	431	436	455	Durchschnitt	440
	422	397	412	454	482	417	StD	26,58	33,03	44,00	StD	35,33
	396	454	453	457	489	449	% CV	6,2	7,6	9,7	% CV	8,0
	441	416	405	444	496	412						
3	175	178	144	167	164	209	Durchschnitt	175	160	182	Durchschnitt	172
	169	173	156	175	195	187	StD	7,88	15,47	14,93	StD	15,58
	166	192	158	180	178	179	% CV	4,5	9,7	8,2	% CV	9,1
	171	175	134	167	169	171						
4	100	104	91	87	86	101	Durchschnitt	113	97	93	Durchschnitt	101
	110	99	114	98	94	84	StD	11,41	10,68	9,86	StD	13,32
	118	125	105	99	79	92	% CV	10,1	11,0	10,6	% CV	13,2
	130	114	101	80	108	101						
5	25	24	23	26	19	20	Durchschnitt	25	25	23	Durchschnitt	24
	27	27	29	19	23	23	StD	2,97	3,85	3,21	StD	3,39
	31	21	30	23	26	20	% CV	11,7	15,4	13,9	% CV	13,9
	24	24	28	22	28	25						
6	17	24	19	28	15	21	Durchschnitt	19	18	24	Durchschnitt	20
	19	19	17	21	17	23	StD	2,60	5,88	9,22	StD	6,76
	19	22	15	7	14	33	% CV	13,5	32,7	38,2	% CV	33,1
	18	16	18	19	31	39						

Tabelle 10: PR-3 Präzisions-Studie

Probe	Ergebnisse Tag 1		Ergebnisse Tag 2		Ergebnisse Tag 3		Intra-Test-Präzision				Inter-Test-Präzision	
	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2	Verdün- nung 1	Verdün- nung 2		Tag 1	Tag 2	Tag 3		
1	2535	2631	2723	2541	2447	2718	Durchschnitt	2583	2620	2609	Durchschnitt	2604
	2582	2674	2591	2713	2611	2596	StD	85,75	83,58	90,77	StD	84,36
	2501	2496	2649	2474	2597	2728/	% CV	3,3	3,2	3,5	% CV	3,2
	2726	2521	2632	2636	2542	2633						
2	1349	1536	1434	1501	1785	1414	Durchschnitt	1387	1427	1491	Durchschnitt	1435
	1318	1348	1408	1383	1489	1438	StD	96,71	68,84	144,02	StD	111,88
	1268	1445	1367	1517	1520	1452	% CV	7,0	4,8	9,7	% CV	7,8
	1323	1505	1325	1484	1547	1280						
3	113	118	109	119	107	116	Durchschnitt	120	113	112	Durchschnitt	115
	118	114	132	96	137	93	StD	7,76	11,92	14,42	StD	11,82
	137	118	108	124	98	110	% CV	6,4	10,6	12,8	% CV	10,3
	119	126	111	101	127	110						
4	79	79	73	85	81	79	Durchschnitt	78	80	79	Durchschnitt	79
	73	98	87	84	88	81	StD	9,67	7,06	5,80	StD	7,39
	70	76	76	73	73	72	% CV	12,4	8,8	7,3	% CV	9,4
	82	66	72	89	84	73						
5	15	22	28	15	14	16	Durchschnitt	22	20	22	Durchschnitt	21
	26	18	21	23	15	29	StD	3,74	6,75	6,57	StD	5,63
	21	23	7	27	22	19	% CV	17,3	33,5	30,6	% CV	26,7
	26	22	19	21	26	31						
6	53	53	54	48	52	56	Durchschnitt	56	52	56	Durchschnitt	55
	57	63	54	50	58	51	StD	4,43	3,56	6,52	StD	5,10
	52	61	56	50	66	46	% CV	7,6	6,8	11,6	% CV	9,3
	52	57	57	48	63	58						

Tabelle 11: GBM Präzisions-Studie

Probe	Ergebnisse Tag 1		Ergebnisse Tag 2		Ergebnisse Tag 3		Intra-Test-Präzision				Inter-Test-Präzision	
	Verdünnung 1	Verdünnung 2	Verdünnung 1	Verdünnung 2	Verdünnung 1	Verdünnung 2		Tag 1	Tag 2	Tag 3		
1	773	611	798	672	901	782	Durchschnitt	733	740	812	Durchschnitt	762
	829	809	651	700	812	752	StD	91,15	75,47	48,50	StD	79,35
	706	638	883	705	796	803	% CV	12,4	10,2	60	% CV	10,4
	840	659	743	766	865	782						
2	796	728	651	646	882	794	Durchschnitt	742	714	842	Durchschnitt	766
	736	674	729	824	970	790	StD	54,40	61,63	62,90	StD	80,31
	715	706	676	700	844	821	% CV	7,3	8,6	7,5	% CV	10,5
	846	732	777	706	859	779						
3	115	124	90	93	119	128	Durchschnitt	116	87	112	Durchschnitt	105
	127	95	76	80	118	107	StD	11,93	12,40	10,69	StD	17,28
	115	118	101	64	95	101	% CV	10,3	14,3	9,6	% CV	16,5
	130	103	98	91	116	109						
4	163	130	107	83	94	92	Durchschnitt	112	98	98	Durchschnitt	103
	118	89	103	101	115	106	StD	27,21	7,86	8,67	StD	17,74
	122	86	103	96	95	102	% CV	24,2	8,1	8,8	% CV	17,3
	108	82	97	90	89	94						
5	41	15	29	36	14	2	Durchschnitt	22	21	25	Durchschnitt	23
	25	29	21	20	24	29	StD	9,68	9,74	11,63	StD	10,06
	13	17	20	26	30	31	% CV	44,0	45,6	46,5	% CV	44,1
	13	23	16	3	38	32						
6	41	26	16	50	39	24	Durchschnitt	28	33	21	Durchschnitt	27
	7	18	35	32	17	27	StD	10,91	14,10	9,05	StD	12,51
	33	31	55	33	19	11	% CV	39,1	45,9	43,6	% CV	46,0
	30	37	32	10	15	14						

3. Kreuzreaktivität

Die MPO und PR-3 Analyten des Zeus **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus Testsystems wurden auf potentielle Kreuzreaktivität mit anderen Antikörpern und Interferenz von Serumbestandteilen geprüft. Für diese Studie wurden insgesamt 35 Proben bewertet. Fünfzehn der Proben ergaben ein positives Ergebnis für verschiedene Autoimmun- und Infektionskrankheits-Antikörper. Von 15 bewerteten Proben war eine reaktiv auf den MPO-Analyt und dieselbe Probe war positiv für den PR-3-Analyt. Der GBM-Analyt wurde unter Verwendung von insgesamt 26 Proben auf potenzielle Kreuzreaktivität auf andere Antikörper und Interferenz von Serumbestandteilen bewertet. 26 Proben ergaben ein positives Ergebnis für verschiedene Autoimmun- und Infektionskrankheits-Antikörper. Alle der 26 bewerteten Proben blieben negativ im GBM-Test, was beweist, dass die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktivität gering ist. Des weiteren wurden 10 Proben mit hohen MPO-Werten und 10 Proben mit hohen PR-3-Werten auf Kreuzreaktivität mit GBM geprüft. Alle 20 Proben blieben negativ im GBM-Test, was beweist, dass die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktivität zwischen MPO und PR-3 mit GBM gering ist.

4. Störsubstanzen

Insgesamt wurden 20 MPO/PR-3-Proben bewertet, die potentielle Störsubstanzen enthielten. Diese 20 Proben enthielten entweder abnorme Hämolysepegel (n=5), Bilirubinspiegel (n=5), eine IgG-Konzentration über dem Normalwert (n=5) oder Lipidspiegel über dem Normalwert (n=5). Zwei der Proben waren positiv für sowohl die MPO- als auch die PR-3-Analyten. Insgesamt wurden 6 GBM-Proben mit potentiellen Störsubstanzen bewertet. Diese 6 Proben wiesen abnorme Hämolysepegel (n=2), Bilirubinspiegel (n=2) Spiegel, über dem Normalwert liegende Lipidspiegel (n=2), Albumin (n=2), Cholesterin (n=2) oder Triglyzeride (n=2) auf. Die qualitativen Ergebnisse für alle sechs Proben blieben unverändert mit Ausnahme einer Probe, die einen hohen Cholesterinspiegel aufwies und zwei Proben, die hohe Triglyzeridspiegel aufwiesen. Lipemische Proben können die Ergebnisse dieses Tests beeinträchtigen. Die Verwendung derartiger Proben sollte vermieden werden.

LITERATUR

- Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology. Br. J. Med. 285: 606, 1982
- van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 1: 425-429, 1985.
- Feehally J, Wheeler DC, Walls J, et al: A case of microscopic polyarteritis associated with antineutrophilia cytoplasmic antibodies. Clin. Nephrol. 27: 214-215, 1987
- Falk RJ, Becker M, Terrell R, Jennette JC: Antigen specificity of P-ANCA and C-ANCA (Abstract). The 3rd International Workshop on ANCA, Washington, DC 1990: 2-3.
- Jennette JC, Falk RJ: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N.Engl.J. Med. 318: 1651-1657, 1988.
- Savage COS, Tizard J, Jayne D, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Kawasaki disease. Arch. Dis. Child. 64: 360-363, 1989.
- Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J: Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. J. Intern. Med. 238: 143-152, 1995.
- Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterisation of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture syndrome: Kidney Int. 46: 823-829, 1994.
- Wieslander J, Barr J, Butkowski R, Edwards S, Bygren P, Heinegard D, Hudson B: Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: Localization to noncollagenous regions of type IV collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3838-42, 1984.
- Butkowski R, Wieslander J, Wisdom B, Barr J, Noelken M, Hudson B: Properties of the globular domain of type IV collagen and its relationship to the Goodpasture antigen. J. Biol. Chem. 262: 7874-7877, 1987.
- Butkowski R, Langveld J, Wieslander J, Hamilton J, Hudson B: Localization of Goodpasture epitope to novel chain of basement membrane collagen. J. Biol. Chem. 260: 3739-3747, 1985.

12. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 4th Ed., 1999.
13. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed.Register 56:64175-64182, 1991.
14. Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12), 1997.
15. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Gebührenfrei (USA): 1-800-286-2111, Option 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

AtheNA Multi-Lyte und SAve Diluent® sind Marken von ZEUS Scientific, Inc.

Für Kundenservice in den USA wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Vertriebspartner.

Für technischen Support in den USA wenden Sie sich bitte telefonisch an ZEUS Scientific oder senden eine E-Mail an ansupport@zeusscientific.com.

Für Kundenservice und technischen Support außerhalb der USA wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Vertriebspartner.

© 2017 ZEUS Scientific, Inc. Alle Rechte vorbehalten.



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands