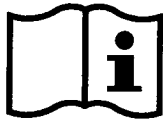


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com




User's Manual

Anti-ASGPR IgG ELISA

Enzyme Immunoassay for the determination of IgG antibodies to asialoglycoprotein receptor in human serum or plasma



REF DE4271

 96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	PATIENT SAMPLES.....	3
4	TEST COMPONENTS.....	4
5	ASSAY PROCEDURE.....	5
6	DATA PROCESSING	5
7	REFERENCE VALUES	6
8	CHARACTERISTIC ASSAY DATA.....	6
9	INCUBATION SCHEME	7
10	SAFETY PRECAUTIONS.....	7
1	ANWENDUNG	8
2	TESTPRINZIP.....	8
3	PATIENTENPROBEN	9
4	TESTKOMPONENTEN	9
5	TESTDURCHFÜHRUNG.....	10
6	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	11
7	REFERENZWERTE.....	11
8	TESTCHARAKTERISTIKA.....	12
9	ASSAY - SCHEMA	13
10	ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1 INTENDED USE

Anti-ASGPR is used for the semi-quantitative determination of IgG antibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in human serum or plasma.

ASGPR is a liver specific membrane receptor playing a pivotal role in the endocytosis of glycoproteins from the blood. An induction of humoral and cellular immune mechanisms to the ASGPR has been observed in the course of inflammatory liver disorders especially autoimmune hepatitis. The level of ASGPR autoantibodies correlates with the severity of the disease and declines under therapy.

The group of primary autoimmune liver disease (PAL) comprises autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). Autoimmune hepatitis is a chronic inflammation of the liver with a yet unknown etiology. It comprises mild clinical forms as well as severe progressive hepatitis with lethal outcome. Females are more frequently affected. Clinical signs of the disease can occur as early as in their twenties. Patients suffering from AIH show a variety of autoantibodies. Due to the appearance of different antibody specificities classification of AIH into different subgroups is discussed. Type I is characterized by the occurrence of antinuclear antibodies (ANA) and antibodies to smooth muscles (ASMA). For type II a high prevalence of antibodies to liver and kidney microsomal antigens (LKM) has been described. LC1 antibodies are specific for type II hepatitis, too. Patients with type III autoimmune hepatitis exhibit antibodies to the soluble liver antigen (SLA). ASGPR autoantibodies can be detected in sera of up to 76% of patients suffering from AIH. However, patients with viral hepatitis may develop ASGPR autoantibodies, too. Therefore a viral genesis of the liver disorder should be excluded. Determination of autoantibodies to ASGPR supports the follow-up and the differential diagnosis of toxic and other chronic inflammatory liver disorders.

McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R: Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986 3, 196-205

Treichel U, Poralla T., Hess G, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH: Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology* 1990 11, 606-612

2 PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-ASGPR is an enzyme immunoassay for the semi-quantitative determination of IgG antibodies to ASGPR. The antibodies of the calibrators and diluted patient samples react with ASGPR immobilized on the solid phase of microtiter plates. ASGPR highly purified from rabbit liver and coated on the microtiter plate guarantees the specific binding of ASGPR IgG antibodies of the specimen under investigation. Following an incubation period of 60 min at 37 °C, unbound serum components are removed by a washing step. The bound IgG antibodies react specifically with anti-human-IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) within an incubation period of 30 min at 37 °C. Excessive conjugate is separated from the solid-phase immune complexes by the following washing step. Horseradish peroxidase converts the colorless substrate solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) added into a blue product. The enzyme reaction is stopped by dispensing an acidic solution into the wells after 10 minutes at room temperature turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution at 450 nm is directly proportional to the amount of specific antibodies bound.

3 PATIENT SAMPLES

3.1 Specimen collection and storage

Blood is taken by venipuncture. Serum is separated after clotting by centrifugation. Plasma can be used, too. Lipaemic, haemolytic and contaminated samples should not be used. Repeated freezing and thawing should be avoided. If samples are to be used for several assays, initially aliquot samples and keep at -20 °C.

3.2 Preparation before use

Allow samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate serum samples gently in order to ensure homogeneity.

***Note: Patient samples have to be diluted 1 + 100 (v/v),
e.g. 10 µL sample + 1.0 mL sample diluent (C), prior to assay.***

The samples may be kept at 2 - 8 °C for up to two days. Long-term storage requires - 20 °C.

4 TEST COMPONENTS

for 96 determinations

A SORB MT	Microtiter plate , 12 breakable strips per 8 wells (total 96 individual wells) coated with ASGPR (rabbit)	1, vacuum sealed with desiccant
B BUF WASH 10x	Concentrated wash buffer sufficient for 1000 mL solution	100 mL, concentrate capped white
C SAM DIL	Sample diluent	100 mL, ready for use capped black
D CONJ	Conjugate containing anti-human-IgG-(sheep) coupled with HRP	15 mL, ready for use capped red
E SUB TMB	Substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in citrate buffer containing hydrogen peroxide	15 mL, ready for use capped blue
F STOP SOLN	Stop solution 0.5 N acidic solution	15 mL, ready for use capped yellow
P CONTROL +	Positive control (diluted serum)	1 mL, ready for use
Co CONTROL Co	Cut-off control (diluted serum)	1 mL, ready for use
N CONTROL -	Negative control (diluted serum)	1 mL, ready for use

4.1 Materials required

- micropipette 100 - 1000 µL
- micropipette 10 - 100 µL
- multi-channel pipette 50 - 200 µL
- rough for multi-channel pipette
- 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer
- incubator (37 °C)
- microplate reader with optical filters for 450 nm and 620 nm or 690 nm
- graduated cylinders
- distilled or de-ionized water

4.2 Size and storage

Anti-ASGPR has been designed for 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label that of the complete kit on the box labels. Upon receipt, all components of the Anti-ASGPR have to be kept at 2 - 8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage.

4.3 Preparation before use

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtiter plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed microplate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the concentrated wash buffer 10 times (1 + 9) with de-ionized or distilled water. For example, dilute 8 mL of the concentrate with 72 mL of distilled water per strip. The wash solution prepared is stable at 2 - 8 °C up to 30 days. Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle.

Avoid exposure of the TMB substrate solution to light!

5 ASSAY PROCEDURE

- Dilute patient sera with sample diluent (C) 1 + 100 (v/v), e.g. 10 µL serum + 1.0 mL sample diluent (C).
- Avoid any time shift during pipetting of reagents and samples.
 1. Bring all reagents to room temperature before use. Mix gently without causing foam.
 2. Dispense **100 µL** controls (P, Co, N), **100 µL** diluted patient samples into the respective wells.
 3. Seal plate, incubate **60 min** at 37 °C.
 4. Decant, then wash each well **five** times using **300 µL** wash buffer (B).
 5. Add **100 µL** of conjugate (D) solution to each well.
 6. Seal plate, incubate **30 min** at 37 °C.
 7. Decant, then wash each well **five** times using **300 µL** wash buffer (B).
 8. Add **100 µL** of substrate (E) to each well.
 9. Incubate **10 min protected from light** at room temperature.
 10. Add **100 µL** of stop solution (F) to each well and mix gently.
 11. Read the optical density at **450 nm** versus 620 or 690 nm within **30 min** after adding the stop solution.

6 DATA PROCESSING

Results are interpreted by calculating the following ratio of OD:

$$\text{ratio} = \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{cut-off control}}$$

This calculation can be done by the integrated evaluation software of the microplate reader used, too.

Example of typical assay results

wells	OD (a)	OD (b)	OD (mean)	ratio
Positive control	1.472	1.450	1.461	3.8
Cut-off control	0.387	0.373	0.380	1.0
Negative control	0.022	0.018	0.020	0.1
Patient 1	0.144	0.134	0.149	0,4 negative
Patient 2	0.591	0.559	0.575	1,5 positive
Patient 3	0.183	0.190	0.186	0,5 negative

6.1 Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is ≤ 0.3
- the mean OD of the positive control is ≥ 0.7

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

7 REFERENCE VALUES

Anti-ASGPR	ratio
negative	< 0.9
grey zone	0.9 – 1.1
positive	≥ 1.1

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges for serum Anti-ASGPR levels, as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

7.1 Limitations of Method

Healthy individuals should be tested negative by the Anti-ASGPR. However, ASGPR autoantibody positive apparently healthy persons do occur. Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

8 CHARACTERISTIC ASSAY DATA**8.1 Calibration**

Due to the lack of an international reference material the content of ASGPR autoantibodies in samples is given as ratio of OD.

8.2 Linearity

Defined dilutions of the reference material with anti-ASGPR free human serum are found congruent to calculation with Anti-ASGPR.

8.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the Anti-ASGPR was determined at 0.3.

8.4 Specificity

The high quality of the immobilized ASGPR ensures the exclusive reaction of ASGPR autoantibodies.

8.5 Functional assay sensitivity

This functional assay sensitivity generally represents that concentration which corresponds to the 10 % (intraassay) and to the 20 % (interassay) coefficient of variation in the respective precision profiles of the assay in the lower concentration range. Upon correct and thorough performance of Anti-ASGPR, this value is found at a ratio of 0.4. Anti-ASGPR values below this defined level of functional assay sensitivity do not meet the statistical criteria for reliability according to GLP (Good Laboratory Practice) and therefore can not be distinguished from zero due to the statistically necessary certainty. Anti-ASGPR concentrations above a ratio of 0.4, however, fulfil these criteria and are consequently assessed as valid.

8.6 Precision

Intraassay		Interassay	
mean (ratio)	CV %	mean (ratio)	CV %
0.5	6.6	0.4	16.2
1.4	2.8	1.2	10.8
2.8	6.5	4.2	7.5

9 INCUBATION SCHEME

Dilute patients sample	10 µL serum + 1.0 mL sample diluent (C)
-------------------------------	--

1	Bring all reagents to room temperature (18-25°C)		
2	Pipette	controls (P, Co, N)	100 µL
		1 + 100 prediluted sera	100 µL
3	Seal plate and incubate		60 min, 37 °C
4	Wash		
	Decant, 5 x 300 µL (made of B)		
5	Pipette conjugate (D)		100 µL
6	Seal plate and incubate		30 min, 37 °C
7	Wash		
	Decant, 5 x 300 µL (made of B)		
8	Pipette substrate (E)		100 µL
9	Incubate protected from light		
	10 min, room temperature (18-25 °C)		
10	Pipette stop solution (F)		100 µL
11	Read at 450 nm against 620 (690) nm within 30 min.		

10 SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro use only.** Follow the working instructions carefully. DEMEDITEC and its authorized distributors shall not be liable for damages indirectly or consequentially brought about by changing or modifying the procedure indicated. The kit should be performed by trained technical staff only.
- The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for reconstituted reagents.
- Do not use or mix reagents from different lots.
- Do not use reagents from other manufacturers.
- Avoid time shift during pipetting of reagents.
- All reagents should be kept at 2 °C - 8 °C before use in the original shipping container.
- Some of the reagents contain small amounts of Thimerosal (< 0.1 % w/v) and Kathon (1.0 % v/v) as preservatives. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa.
- Source materials derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and for HIV as well as HCV antibodies. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.
- Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:
 - Do not smoke, eat or drink while handling kit material,
 - Always use protective gloves,
 - Never pipette material by mouth,
 - Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant.

1 ANWENDUNG

Anti-ASGPR ist ein Reagenziensatz zur semiquantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen den Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) in humanem Serum oder Plasma.

Der ASGPR ist ein leberspezifischer Membranrezeptor, der funktionell an der Endozytose von Glykoproteinen aus dem Serum beteiligt ist. Bei entzündlichen Lebererkrankungen insbesondere bei Autoimmunhepatitiden konnte eine Induktion von zellulärer und humoraler Immunreaktivität gegen den ASGPR nachgewiesen werden. Der ASGPR-Autoantikörperspiegel korreliert mit dem klinischen Verlauf der Entzündung und zeigt einen Abfall unter entsprechender Therapie. Die autoimmune Hepatitis (AIH) stellt eine chronisch entzündliche Erkrankung mit bisher unklarer Genese dar. Dabei kann es sich um milde Krankheitsverläufe sowie um progressive Hepatitiden mit letalem Ausgang handeln. Sie betrifft vorwiegend das weibliche Geschlecht, wobei erste Symptome bereits vor dem 30. Lebensjahr auftreten können. Bei der Abgrenzung der Autoimmunhepatitiden zur primären biliären Zirrhose oder zu infektiösen Lebererkrankungen (Hepatitis B und C), ist der Nachweis von Autoantikörpern von Bedeutung. An Hand der Vielzahl der heute bekannten Autoantikörper ist eine Unterteilung der autoimmun Hepatitis in 3 Subgruppen möglich. Charakteristisch für den Typ I ist der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) und Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA). Hingegen werden beim Typ II Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosomen und Cytochrom P450 2D6 gefunden. Seren von Patienten mit Typ III Autoimmunhepatitis weisen lediglich Antikörper gegen das lösliche Leberantigen auf. Bei etwa 76 % der Patienten mit AIH konnten ASGPR Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. Da auch Patienten mit chronischer viraler Hepatitis Antikörper gegen den ASGPR entwickeln können, müssen zur Abgrenzung weitere diagnostische Untersuchungen erfolgen. Mit dem Nachweis von ASGPR Autoantikörpern im Anti-ASGPR ist eine serologische Verlaufskontrolle der AIH sowie eine zusätzliche differentialdiagnostische Aussage bei toxischen und anderen chronisch entzündlichen Lebererkrankungen möglich.

McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R: Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986 3, 196-205

Treichel U, Poralla T., Hess G, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH: Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology* 1990 11, 606-612

2 TESTPRINZIP

Der Anti-ASGPR ist ein Enzymimmunoassay zur semiquantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen den ASGPR. Die Antikörper in den Kontrollen und verdünnten Patientenproben reagieren im ersten Reaktionsschritt mit dem an der festen Phase gebundenen, aus Kaninchenleber gereinigten ASGPR. Nicht-gebundene Komponenten werden nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C durch einen Waschschrift entfernt. Die gebundenen ASGPR-Autoantikörper reagieren im zweiten Reaktionsschritt spezifisch mit anti-human-IgG Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt sind. Überschüssige Konjugatmoleküle werden nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C von den an der festen Phase gebundenen Immunkomplexen durch einen weiteren Waschschrift getrennt. Die Meerrettichperoxidase setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe einer sauren Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Menge der anti-ASGPR Autoantikörper direkt proportional.

3 PATIENTENPROBEN

3.1 Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation isolieren. Die Lagerung ist bis zu 3 Tagen bei 2-8 °C möglich, darüber hinaus müssen die Proben bei -20 °C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, ggf. sollte vor dem Einfrieren aliquotiert werden. Lipämische, hämolytische und kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.

3.2 Vorbereitung und Verwendung

Vor dem Einsatz im Anti-ASGPR werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht. Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine entsprechende Homogenität gesichert werden.

Achtung: Die Patientenproben müssen vor Einsatz im Test 1 + 100 (v/v) verdünnt werden, z. B. **10 µL Probe + 1,0 mL Probenverdünner C** (Kalibratoren sind bereits entsprechend vorverdünnt).

4 TESTKOMPONENTEN

für 96 Bestimmungen

A SORB MT	Mikrotiterplatte mit 12 teilbaren Streifen zu je 8 Kavitäten (insgesamt 96) beschichtet mit gereinigtem ASGPR (Kaninchen)	1, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel, 2 selbstklebende Folien
B BUF WASH 10x	Waschpuffer, 10-fach für 1000 mL Lösung	100 mL Konzentrat weiße Kappe
C SAM DIL	Probenverdünner	100 mL, gebrauchsfertig schwarze Kappe
D CONJ	Konjugat enthält anti-human-IgG vom Schaf, gekoppelt mit POD	15 mL, gebrauchsfertig rote Kappe
E SUB TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid	15 mL, gebrauchsfertig blaue Kappe
F STOP SOLN	Stopplösung 0,5 N saure Lösung	15 mL, gebrauchsfertig gelbe Kappe
P CONTROL +	Positive Kontrolle (Verdünntes Serum)	1 mL, gebrauchsfertig
Co CONTROL Co	Cut-off Kontrolle (Verdünntes Serum)	1 mL, gebrauchsfertig
N CONTROL -	Negative Kontrolle (Verdünntes Serum)	1 mL, gebrauchsfertig

4.1 Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- verstellbare Einkanal-Mikropipette 100 - 1000 µL
- verstellbare Einkanal-Mikropipette 10 - 100 µL
- verstellbare 8-Kanalpipette 50 - 200 µL
- Pipettenspitzen
- Flüssigkeitsreservoir für 8-Kanalpipette
- 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Brutschrank (37 °C)
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischen Filtern für 450 nm und 620 nm oder 690 nm
- Messzylinder
- Bechergläser
- Eppendorfröhrchen 2 mL
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

4.2 Menge und Lagerung

Jede Packung Anti-ASGPR enthält die Reagenzien für 96 Bestimmungen. Das Verfallsdatum des kompletten Reagenziensatzes ist auf dem Außenetikett des Testbesteckes angegeben. Die Verfallsdaten der Einzelreagenzien können ggf. darüber hinausgehen und sind auf den jeweiligen Reagenzien vermerkt. Bis zur Verwendung sind alle Reagenzien des Anti-ASGPR bei 2 - 8 °C zu lagern. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 - 8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

4.3 Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Strips ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach dem Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpufferkonzentrat 10-fach (1 + 9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel:

8 mL Waschpufferkonzentrat + 72 mL destilliertes Wasser pro Streifen. Die auf diese Weise verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C - 8 °C mindestens 30 Tage haltbar. Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen.

Substrat Licht geschützt aufbewahren.

5 TESTDURCHFÜHRUNG

- **Patientenproben 1 + 100 (v/v) vorverdünnen z.B. 10 µL Serum + 1 mL Probenverdünner (C)**
- **Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.**

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur bringen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. Pipettieren von **100 µL** Kontrollen (Co, P, N), **100 µL** der **1/101** verdünnten Patientenseren in die vorgesehenen Kavitäten.
3. Streifen mit selbstklebender Folie abdecken, **60 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
4. Dekantieren und **5 mal** mit **300 µL** Waschpuffer (verdünnt aus B) waschen.
5. **100 µL** Konjugat (D) in jede Kavität pipettieren.
6. Streifen mit selbstklebender Folie abdecken, **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
7. Dekantieren und **5 mal** mit **300 µL** Waschpuffer (verdünnt aus B) waschen.
8. **100 µL** Substrat (E) in jede Kavität pipettieren.
9. **10 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) **im Dunkeln** inkubieren.
10. **100 µL** Stopplösung (F) in jede Kavität pipettieren und kurz schütteln.
11. Messen der OD bei **450 nm** gegen 620 (690) nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von **30 Minuten**.

6 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgt semi-quantitativ über die Berechnung des Bindungsindex (BI):

$$BI = OD_{\text{Probe}} / OD_{\text{cut-off Kontrolle}}$$

Diese Auswertung lässt sich auch automatisch über die integrierte Auswerteeinheit des Mikrotiterplatten-Photometers durchführen.

BERECHNUNGSBEISPIEL

Kavitäten	OD (a)	OD (b)	OD (Mittelwert)	BI
Positivkontrolle	1,472	1,450	1,461	3,8
Cut-off Kontrolle	0,387	0,373	0,380	1,0
Negativkontrolle	0,022	0,018	0,020	0,1
Patient 1	0,144	0,134	0,149	0,4 negativ
Patient 2	0,591	0,559	0,575	1,5 positiv
Patient 3	0,183	0,190	0,186	0,5 negativ

6.1 Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der Negativen Kontrolle $\leq 0,30$
- OD-Mittelwert der Positiven Kontrolle $\geq 0,70$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

7 REFERENZWERTE

Anti-ASGPR	BI
negativ	< 0,9
Graubereich	0,9 – 1,1
positiv	> 1,1

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche für ASGPR Antikörper bestimmen sollte. Oben genannte Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

7.1 Grenzen der Methode

Gesunde Individuen sollten mit dem Anti-ASGPR Testbesteck negativ bestimmt werden. Asymptomatische Probanden können jedoch ASGPR Autoantikörper aufweisen. Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle möglichen klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 Kalibrierung

Da für Anti-ASGPR Autoantikörper kein internationales Referenzserum existiert, wird der Anti-ASGPR mit BI ausgewertet.

8.2 Parallelität

Definierte Verdünnungen von ausgewählten positiven Serumproben in ASGPR autoantikörperfreiem Humanserum werden im Anti-ASGPR mit ihren theoretisch erwarteten Werten wieder gefunden.

8.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität liegt bei einem BI von 0,3.

8.4 Spezifität

Durch die hohe Qualität des insolubilisierten ASGPR ist gesichert, dass nur anti-ASGPR Autoantikörper spezifisch erfasst werden.

8.5 Funktionale Assaysensitivität

Die **funktionale Assaysensitivität** ist da diejenige Konzentration, die in den Präzisionsprofilen des Assay-Systems dem 10 % Intra-Assay- bzw. dem 20 % Inter-Assay-Variationskoeffizienten (im unteren Konzentrationsbereich) entspricht. Bei präziser Durchführung des Anti-ASGPR liegt dieser Wert bei einem BI von 0,4. Somit sind im Anti-ASGPR formal ermittelte Werte unterhalb ca. 0,4 mit Variationskoeffizienten größer 10 % (Intra-Assay) bzw. 20 % (von Tag zu Tag) behaftet. Derartige Werte liegen außerhalb der nach GLP (good laboratory practice) geforderten statistischen Sicherheit und sind deshalb nicht mehr zuverlässig von Null zu unterscheiden. Anti-ASGPR BI oberhalb 0,4 hingegen genügen diesen statistischen Kriterien und dürfen als direkte Zahlenwerte angegeben werden.

8.6 Präzision

Intra-Assay		Inter-Assay	
MW (BI)	CV %	MW (BI)	CV %
0,5	6,6	0,4	16,2
1,4	2,8	1,2	10,8
2,8	6,5	4,2	7,5

9 ASSAY - SCHEMA











Verdünnen der Patientenseren 10 µL Serum + 1,0 mL Verdünnungspuffer (C)

1	Testreagenzien und Kavitäten auf Raumtemperatur bringen		
2	Pipettieren	Kontrollen	100 µL
		1 + 100 vorverdünnte Seren	100 µL
3	Abkleben und Inkubieren		
	60 Minuten, 37 °C		
4	Waschen		
	Dekantieren, 5 x 300 µL (verdünnt aus B)		
5	Pipettieren Konjugat (D)		100 µL
			100 µL
6	Abkleben und Inkubieren		
	30 Minuten, 37 °C		
7	Waschen		
	Dekantieren, 5 x 300 µL (verdünnt aus B)		
8	Pipettieren Substrat (E)		100 µL
			100 µL
9	Inkubieren im Dunkeln		
	10 Minuten, Raumtemperatur (18-25°C)		
10	Pipettieren Stopplösung (F)		100 µL
			100 µL
11	Messen 450 nm gegen 620 (690) nm		

10 ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das Testbesteck ist ausschließlich für in vitro Untersuchungen bestimmt und muss von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.
- Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- Dies gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) und Thimerosal (0,01 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.
- Die empfohlene Lagertemperatur angebrochener Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2 °C - 8 °C.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. AK gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:
 - Nicht essen, trinken oder rauchen!
 - Nie mit dem Mund pipettieren!
 - Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Seren tragen!
 - Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!
- Wir empfehlen, mittels laborinterner Kontrollseren eigene Qualitätskontrollen durchzuführen (s.a. Eichordnung, Bundesgesetzblatt I, S. 1657, 1988 sowie Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Dt. Ärzteblatt 98, Heft 42, S. A2747-59, 2001).

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità