

EN The English version of the INSTRUCTIONS FOR USE is available for download from: <http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest-elisa/>



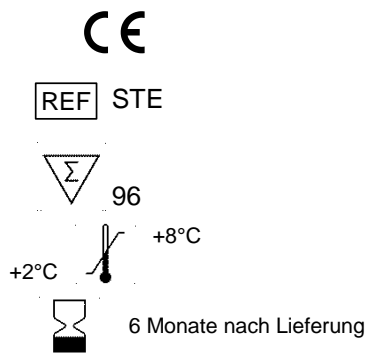
PRODUKT- UND GEBRAUCHSINFORMATIONEN

(Überarbeitung 20170303_DE
Ersetzt: Überarbeitung 20170131_DE)

Selenotest ELISA

Version 4

Kolorimetrischer Enzym-Immunoassay zur quantitativen
Messung von menschlichen Selenoprotein P in Serum



VERWENDUNGSZWECK

Der Selenotest ELISA wurde für die quantitative Messung von menschlichem Selenoprotein P (SELENO P, SeP, SELP, SEPP1, P49908) Konzentrationen in verdünnten Serumproben entwickelt und validiert.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Der Selenotest ELISA [1,2] ist ein chromogener Enzyme-Linked Immunosorbent Assay für die quantitative Messung von menschlichen Selenoprotein P [3] in Serumproben.

Der ELISA verwendet spezifische monoklonale Antikörper gegen menschliches Selenoprotein P als Fänger- und Detektions-Antikörper.

Der Selenotest ELISA Kit enthält eine mit dem Fänger-Antikörper vorbeschichtete Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten und gefriergetrocknete, vorverdünnte Kalibratoren und Kontroll-Proben und weitere für die Testdurchführung notwendige Komponenten.

Der Selenotest ELISA verwendet 8 Serum-Kalibratoren (6 Kalibrator- und 2 Ankerpunkte), 3 Serum-Kontrollproben (niedrig, mittel, hoch) und eine Leerwert-Kontrolle, die frei auf der Testplatte platziert werden können. Die Selenoprotein P Konzentrationen der Kalibrator- und Kontrollproben werden durch Kalibrierungsmessungen gegen Verdünnungsreihen von NIST SRM 1950 Standard Reference Plasma [4,5,6] für jede Kit-Charge ermittelt.

Der Messbereich liegt in Abhängigkeit der jeweiligen Kalibrierung im Bereich von 400 ng/mL bis 10 ng/mL Selenoprotein P. Das entspricht in Abhängigkeit vom Probenverdünnungsfaktor einem Konzentrationsbereich von mindestens 10,0 mg/L bis 0,5 mg/L Selenoprotein P in der unverdünnten Serumprobe.

Es können mit einer Testplatte 72 Serumproben in Einzelbestimmung oder 36 Serumproben in Doppelbestimmung analysiert werden. Die Proben werden für die Messung in Probenverdünnungspuffer verdünnt. Der empfohlene Probenverdünnungsfaktor ist chargenspezifisch und wird aus dem EC_{50} -Wert der aktuellen Kalibrierung ermittelt. Es werden zwischen 5 bis 10 μ L Serumprobe pro Einzelbestimmung benötigt.

Der Test wird nach einem Standard-ELISA-Protokoll bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Mikrotiter-Plattenschüttlers durchgeführt. Der Test kann manuell oder teilautomatisiert durchgeführt werden.

Der Selenotest ELISA verwendet ein TMB-basiertes chromogenes Peroxidase-Substrat, welches nach dem Abstoppen der Nachweisreaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert wird.

Der Test benötigt eine Durchführungszeit von ca. 5 bis 6 Stunden. Von einer Laborfachkraft können an einem Arbeitstag mindestens 6 Testplatten parallel verarbeitet werden.

Das Test-Protokoll wurde für Messung einer großen Anzahl von Proben, wie z.B. in klinischen Biomarker-Studien, entwickelt.

Der Selenotest ELISA wurde auf der Grundlage von FDA-, ICH- und Expertengruppen-Empfehlungen [7,8,9,10] für die Verwendung in klinischen Studien entwickelt und in einer Multi-Laborstudie mit kaukasischen Spenderseren validiert.

Zusätzlich wurden mehr als 20.000 klinische Proben unterschiedlicher Indikationsgebiete mit dem Selenotest ELISA analysiert.

Eine Liste mit wissenschaftlichen Arbeiten, die den Selenotest ELISA verwendet haben, ist als PDF-Download verfügbar unter: <http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest-elisa/>

CE-KENNZEICHNUNG

Auf das Produkt Selenotest ELISA wurde das Konformitätsbewertungsverfahren gemäß Anhang III ohne Abschnitt 6 der Richtlinie 98/79/EG angewandt und die CE-Kennzeichnung gemäß Artikel 16 und Anhang X der Richtlinie 98/79/EG angebracht.

Die EG-Konformitätserklärung ist als PDF-Download verfügbar unter: <http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest-elisa/>

Das Produkt Selenotest ELISA wird gemäß Abschnitt 05, Absatz (C) der MEDDEV Richtlinie 2.14/2 rev.1 (Research Use Only products) vom Februar 2004, als ein Produkt für Forschungszwecke zur Verwendung für die Identifizierung und Quantifizierung von einzelnen chemischen Substanzen oder Liganden in biologischen Proben, eingestuft und kann zu diesem Zweck von Forschungs-, pharmazeutischen und medizinisch-diagnostischen Laboratorien verwendet werden.



InVivo BioTech Services GmbH
Neuendorfstr. 24a
16761 Hennigsdorf
Germany
phone: +49 (0) 3302 883 769
fax: +49 (0) 3302 883 771
email: info@invivo.de
web: www.invivo.de



ISO 9001:2008 Certified Company
Registration No. 320103 QM08

TESTPRINZIP

Der Selenotest ELISA basiert auf dem Sandwich ELISA Prinzip. Monoklonale Antikörper gegen menschliches Selenoprotein P sind an der Oberfläche der Testplatte gebunden. Zu untersuchende Serumproben werden in einem Probenverdünnungspuffer vorverdünnt und die verdünnten Proben zusammen mit den rekonstituierten Kalibrator- und Kontrollproben in die Testplatte übertragen. Selenoprotein P aus den Proben wird vom Antikörper in der Testplatte gebunden.

Im nächsten Schritt wird ein zweiter, Biotin-markierter monoklonaler Antikörper gegen menschliches Selenoprotein P dazugeben, welcher an das vom ersten Antikörper in der Testplatte gebundene Selenoprotein P bindet.

Im folgenden Schritt wird Streptavidin konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) dazugeben, das an die Biotin-Markierung des an Selenoprotein P gebundenen zweiten Antikörpers bindet.

Im letzten Schritt wird ein TMB-basiertes Peroxidase-Substrat dazugegeben und als Reaktionsprodukt entsteht ein blauerscheinender Farbstoff. Die enzymatische Peroxidase-Reaktion wird durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Durch die gleichzeitige Änderung des pH-Wertes kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums und spektralen Absorptionskoeffizienten des entstanden Reaktionsproduktes. Die Lichtabsorption des nun gelberscheinenden Farbstoffes wird mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die gemessene Absorption steht in direkter Beziehung zu der in der Probe enthaltenen Menge an menschlichem Selenoprotein P.

LEISTUNGSMERKMALE

Jede neu produzierte Charge des Selenotest ELISA wird mit 3% der hergestellten Test-Kits, verteilt auf mindestens 3 Anwender und mindestens 3 Test-Tage, qualitätsgetestet. Während der Testung werden die wesentlichen Leistungsmerkmale der Test-Kit-Charge basierend auf den Definitionen und Anforderungen von FDA-, ICH- und Expertengruppen-Empfehlungen [7,8,9,10] ermittelt.

Die Ergebnisse der Qualitäts- und Leistungsprüfung sind jedem Test-Kit in Form eines Qualitäts-Zertifikates beigelegt und zusätzlich als PDF-Datei-Download verfügbar unter: <http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest-elisa>

Ergebnisse der Validierung der analytischen Leistungsfähigkeit des Selenotest ELISA sind in der folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichung zusammengefasst:

HYBSIER, S., T. SCHULZ, Z. WU, I. DEMUTH, W.B. MINICH, K. RENKO, E. RIJNTJES, J. KÖHRLE, C.J. STRASBURGER, E. STEINHAGEN-THIESSEN and L. SCHOMBURG. Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biology*. 2017, **11**, 403-414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.025>

EINSCHRÄNKUNGEN

- 1 Die Leistungsfähigkeit des Testes wurde nicht für die Analyse von Proben von Individuen mit geschwächtem Immunsystem evaluiert.
- 2 Wenn die Probe Autoantikörper gegen menschliches Selenoprotein P enthält, kann dies zu fehlerhaften Messergebnissen führen.
- 3 Wenn die Probe heterologe Antikörper gegen Maus-Immunglobulin enthält, kann dies zu fehlerhaften Messergebnissen führen.
- 4 Der Test wurde nicht für die Messung anderer Selenhaltiger Proteine als menschliches Selenoprotein P oder Selenoprotein P aus anderen Spezies als Mensch evaluiert.
- 5 Die Leistungsfähigkeit des Testes wurde nicht für andere Probenmaterialien als Serum untersucht.
- 6 Die Kalibrierung der Standards und Kontrollproben ist nur für Serum als Probenmatrix gültig

REFERENZBEREICHE

Da eine diagnostische Anwendungsmöglichkeit von Selenoprotein P immer noch Gegenstand klinischer Forschung ist, kann der Assay nicht für die *in-vitro* diagnostische Anwendung validiert werden. Deshalb muss ein Normalbereich, wenn dieser für klinische Aussagen benötigt wird, vom Anwender selbst ermittelt werden.

KIT-INHALT UND GEBRAUCHSHINWEISE

1	SORB AB	Testplatte mit Selenoprotein P Antikörpern vorbeschichtete 96 well Mikrotiterplatte Hinweis: Der Folienbeutel sollte erst geöffnet werden, wenn Raumtemperatur angenommen wurde, damit es nicht zur Kondensation von Feuchtigkeit in den Kavitäten der Testplatte kommt.	1 Stk.
2	CAL 1 CAL 2 CAL 3 CAL 4 CAL 5 CAL 6 CAL 7 CAL 8	Kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Kalibrator-Serumproben, gefriergetrocknet Hinweis: Enthalten menschliches Serum und ProClin 950. Warnhinweise 2 und 3 beachten.	0,5 mL
3	CONTROL L CONTROL M CONTROL H	Kontrolle L, M, H Kontroll-Serumproben, gefriergetrocknet Hinweis: Enthalten menschliches Serum und ProClin 950. Warnhinweise 2 und 3 beachten.	0,5 mL
4	CONTROL B	Kontrolle B Reagenzleerwert, gefriergetrocknet Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten.	0,5 mL
5	CONJ AB	Detektions-Antikörper Konzentrat des Biotin- markierten Detektions- antikörpers	0,15 mL
6	CONJ EN	Enzym-Konjugat Konzentrat des Peroxidase- Streptavidin-Konjugates	0,15 mL
7	BUF RCNS	Rekonstitutionspuffer gebrauchsfertiger Puffer zum Wiederherstellen der gefrier- getrockneten Kalibrator- und Kontrollproben Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten.	8 mL
8	DIL AB	Detektions-Antikörper- Verdünnungspuffer gebrauchsfertiger Puffer zum Verdünnen des Detektions- Antikörper-Konzentrates Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten.	12 mL
9	DIL EN	Enzym-Konjugat Verdünnungspuffer gebrauchsfertiger Puffer zum Verdünnen des Enzym- Konjugat-Konzentrates Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten.	12 mL
10	DIL SPE	Probenverdünnungspuffer gebrauchsfertiger Puffer zum Verdünnen der Serumproben Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten.	22 mL
11	BUF WASH 10x	10-fach Waschpuffer Konzentrat zum Herstellen von 500 mL 1-fach Waschpuffer Hinweis: Enthält ProClin 950. Warnhinweis 3 beachten. In seltenen Fällen kommt es zur Bildung von Präzipitaten im Waschpufferkonzentrat während der Lagerung bei +2°C bis +8°C. Die Präzipitate lösen sich bei Raumtemperatur oder nach Verdünnen wieder auf und haben keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Puffers.	50 mL
12	SUBS TMB	TMB-Substratlösung gebrauchsfertige Enzym- Substratlösung Hinweis: Die Substratlösung ist lichtempfindlich und sollte erst unmittelbar vor Verwendung in ein Reagenzreservoir umgefüllt werden. Die Substratlösung ist vor der Reaktion farblos und als Reaktionsprodukt entsteht ein blauer Farbstoff. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure ändert sich durch die Änderung des pH-Wertes auch das Absorptionsspektrum des Farbstoffes. Der Farbstoff erscheint dann gelblich.	12 mL
13	SOLN STOP  Achtung	Stop-Lösung verdünnte Schwefelsäure zum Abstoppen der TMB- Substratumsatzreaktion, gebrauchsfertig Hinweis: Schwefelsäure ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Das Sicherheitsdatenblatt ist als Download verfügbar unter: http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest- elisa/ Gefahrenhinweise: Sicherheitshinweise: H315 verursacht P264 Hautreizungen P280 H319 verursacht P302+P352 schwere P305+P351+P338 Augenreizung P332+P313 P337+P313 P362	12 mL
14 -		Abdeckfolien Folien zum luftdichten Verschließen der Testplatte während der Inkubations- schritte Hinweis: Die Abdeckfolien können wiederverwendet werden. Es ist möglich eine Folie für alle Inkubationsschritte zu verwenden. Wenn die Folie durch Proben oder Reagenzlösungen verunreinigt wurde, dann sollte die Folie gewechselt werden, um Kontaminationen im nachfolgenden Inkubations- schritten zu vermeiden.	2 Stk.
15 -		Produkt- und Gebrauchsinformationen	1 Stk.
16 -		Datenblatt – Produkt-Spezifikation	1 Stk.
17 -		Qualitäts-Zertifikat	1 Stk.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 1 Dieses Test-Kit ist ausschließlich für den professionellen Gebrauch durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Es sollte auf die Einhaltung der Empfehlungen zur Guten Laborpraxis und der aktuellen Laborsicherheitsrichtlinien geachtet werden. Wenn erforderlich, sollten Laborschutzbekleidung, Einmalschutzhandschuhe und Schutzbrille während der Testdurchführung getragen werden.
- 2 Das für die Kalibratoren und Kontrollproben verwendete menschliche Serum wurde negativ auf HIV- und HCV-Antikörper getestet. Das Serum war nicht-reaktiv für HBsAg, HIV-1 RNA, HCV RNA. Negativ in einem serologischen Test für Syphilis. Dennoch wird empfohlen diese Komponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln und die für Arbeiten mit infektiösem Material vorgeschriebenen Arbeitsschutz- und Sicherheitsmaßnahmen und Entsorgungsvorschriften einzuhalten.
- 3 Einige Test-Kit-Komponenten enthalten zum Schutz vor mikrobiellen Kontaminationen ProClin 950 (2-Methyl-4-isothiazolin-3-one). ProClin 950 kann sensibilisierend wirken. Der Kontakt von Test-Kit-Reagenzien mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

SONSTIGE ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1 10, 100, 1000 µL Präzisionspipetten mit variablen Volumen
- 2 100, 300 µL 8- oder 12 Kanal-Präzisionspipette oder Mehrkanal-Dispenser-Pipette (variables oder fixes Volumen)
- 3 Reagenz-Reservoir für Mehrkanalpipetten
- 4 96 well Polypropylen Mikrotiterplatte oder Mikroröhrchen für die Probenverdünnung
- 5 Vortex-Mischer
- 6 Zentrifuge für 1,5 und 2 mL Mikroröhrchen
- 7 Mikrotiterplatten-Schüttler
- 8 Mikrotiterplatten-Wascher (optional)
- 9 Mikrotiterplatten-Photometer für 450 nm Absorptionsmessung
- 10 saugfähige Papiertücher
- 11 Aluminiumfolie zum Lichtschutz der Testplatte während der Inkubationsschritte (optional)
- 12 Laborwasser Typ 1 (Reinstwasser) oder Typ 2 (Reinwasser)
- 13 Statistik-Computersoftware für die Datenanalyse

LAGERUNG UND HALTBARKEITSDAUER

Alle Komponenten des Test-Kits sollten bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank bei Temperaturen zwischen +2°C bis +8°C gelagert werden und sind ungeöffnet bei dieser Lagertemperatur bis zum auf der Test-Kit-Verpackung, der Produkt-Spezifikation oder dem Qualitäts-Zertifikat angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

Vor Arbeitsbeginn das Test-Kit komplett aus dem Kühllagerschrank entnehmen und alle Komponenten auf

Raumtemperatur bringen. Alle Kit-Komponenten sind geöffnet, rekonstituiert oder als Arbeitslösung mindestens über einen Arbeitstag (8 bis 12 Stunden) bei Raumtemperatur (20°C bis 28°C) stabil.

Das in Enzym-Konjugat-Verdünnungspuffer (Komponente 9) verdünnte Enzym-Konjugat (Komponente 6) darf nicht eingefroren werden.

TABELLE Temperaturstabilität des ungeöffneten Selenotest ELISA Kits, der rekonstituierten Standards und Kontrollen und der Arbeitslösungen

Temperatur	<-16°C	+5°C	+25°C	+37°C
Selenotest ELISA Kit	bis zu 48 Monate	bis zu 6 Monate	bis zu 28 Tage	bis zu 5 Tage
Standards und Kontrollen, rekonstituiert	bis zu 12 Monate	bis zu 72 h	bis zu 24 h	bis zu 2 h
Detektions-Antikörper, verdünnt	nicht empfohlen	bis zu 72 h	bis zu 12 h	nicht empfohlen
Enzym-Konjugat, verdünnt	nicht empfohlen	bis zu 72 h	bis zu 12 h	nicht empfohlen
Waschpuffer, 1-fach	unbestimmt	bis zu 28 Tage	bis zu 7 Tage	bis zu 24 h

PROBENMATERIAL UND PROBENVORBEREITUNG

Der Selenotest ELISA wurde ausschließlich für die Verwendung von menschlichem Serum als Probenmaterial validiert und verwendet Serum-haltige Kalibrator- und Kontrollproben. Serumproben sollten unmittelbar nach der Gewinnung verarbeitet und eingefroren werden. Serumproben für die Bestimmung von Selenoprotein P können unbestimmte Zeit tiefgefroren aufbewahrt werden. Bei Lagerzeiträumen >1 Jahr wird die Lagerung bei <-60°C empfohlen. Mehrmaliges Auftauen der Serumproben ist möglich und hat keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Selenoprotein P Konzentration der Probe.

Serumproben sollten immer dicht verschlossen gelagert werden, damit während der Lagerung kein Volumenverlust und die Konzentrierung des Analyten auftritt.

Serumproben vor der Selenoprotein P Bestimmung immer vollständig bei Raumtemperatur auftauen und gut vermischen. Serumproben für die Bestimmung von Selenoprotein P mit dem Selenotest ELISA dürfen nicht im Kühlschrank oder bei Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur aufgetaut oder gelagert werden. Selenoprotein P für die quantitative Messung mit dem Selenotest ELISA ist in Serum oder in mit Probenverdünnungspuffer verdünntem Serum mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur (20°C bis 28°C) stabil.

Serumproben nach dem Auftauen immer gut vermischen. Vor dem Öffnen das Probengefäß ggf. kurz zentrifugieren.

Die Proben werden in Probenverdünnungspuffer (Komponente 10) vorverdünnt. Siehe dazu TEST-DURCHFÜHRUNG Schritte 4 und 5.

Der Probenverdünnungsfaktor ist Test-Kit-Chargen-spezifisch und kann der jeweiligen Produkt-Spezifikation zusammen mit dem empfohlenen Pipettivolumen entnommen werden.

Es wird empfohlen von jeder Serumprobe 2 separate Verdünnungen (Doppelbestimmung) in der Probenverdünnungsplatte herzustellen und zu messen. Auf diese Weise können Verdünnungs- oder Durchführungsfehler unterschiedlicher Ursachen erkannt werden.

TABELLE Temperaturstabilität von Serumproben und verdünnten Serumproben für die immunologische Analyse im Selenotest ELISA

Temperatur	<-60°C	<-16°C	+5°C	+25°C	+37°C
Serum, unverdünnt	unbestimmt	bis zu 12 Monate	nicht empfohlen	bis zu 24 h	bis zu 15 min
Serum, verdünnt in Probenpuffer	unbestimmt	bis zu 12 Monate	bis zu 72 h	bis zu 24 h	bis zu 2 h

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Komponenten des Test-Kits werden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Reagenzien können zusammen mit dem Schaumeinsatz aus der Verpackung entnommen werden. Dadurch ist kein zusätzlicher Röhrchen-Ständer erforderlich und die Übersicht über die abgearbeiteten Schritte der Testdurchführung wird erleichtert.

Während die Serumproben auftauen, werden die gefriergetrockneten Kalibrator- und Kontrollproben rekonstituiert und das Detektions-Antikörper-Konzentrat und das Enzym-Konjugat in dem jeweiligen Verdünnungspuffer verdünnt und der 1-fach Waschpuffer hergestellt. Die anderen Komponenten sind fertig für die Verwendung bereitgestellt.

2 <input type="checkbox"/> CAL 1 <input type="checkbox"/> CAL 2 <input type="checkbox"/> CAL 3 <input type="checkbox"/> CAL 4 <input type="checkbox"/> CAL 5 <input type="checkbox"/> CAL 6 <input type="checkbox"/> CAL 7 <input type="checkbox"/> CAL 8	Kalibratoren 1 bis 8 Zu jedem Kalibrator-Lyophilisat 0,5 mL Rekonstitutionspuffer (Komponente 7) geben und für mindestens 5 min bei RT stehen lassen, mit Vortex-Mixer für 2 bis 3 Sekunden mischen und ggf. kurz zentrifugieren. Die rekonstituierten Kalibratoren sind mindestens 24 h bei RT stabil.
3 <input type="checkbox"/> CONTROL L <input type="checkbox"/> CONTROL M <input type="checkbox"/> CONTROL H	Kontrollproben L, M, H Zu jeder Kontrollprobe 0,5 mL Rekonstitutionspuffer (Komponente 7) geben und für mindestens 5 min bei RT stehen lassen, mit Vortex-Mixer für 2 bis 3 Sekunden mischen und ggf. kurz zentrifugieren. Die rekonstituierten Kontrollproben sind mindestens 24 h bei RT stabil.
4 <input type="checkbox"/> CONTROL B	Kontrollprobe B Zur Leerwertkontrolle 0,5 mL Rekonstitutionspuffer (Komponente 7) geben und für mindestens 5 min bei RT stehen lassen, mit Vortex-Mixer für 2 bis 3 Sekunden mischen und ggf. kurz zentrifugieren. Die rekonstituierte Leerwertkontrollprobe ist mindestens 24 h bei RT stabil.

5 <input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> AB	Detektions-Antikörper Zur Reagenzflasche mit 12 mL Detektions-Antikörper-Verdünnungspuffer (Komponente 8) 100 µL Detektions-Antikörper-Konzentrat (Komponente 5) geben, die Flasche verschließen und durch 4 bis 5-mal sanftes Schwenken mischen (Schaumbildung vermeiden, nicht stark schütteln!). Den verdünnten Detektions-Antikörper bei RT aufbewahren und innerhalb von 8 Stunden verwenden.
6 <input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> EN	Enzym-Konjugat Zur Reagenzflasche mit 12 mL Enzym-Konjugat-Verdünnungspuffer (Komponente 9) 100 µL Enzym-Konjugat-Konzentrat (Komponente 6) geben, die Flasche verschließen und durch 4 bis 5-mal sanftes Schwenken mischen (Schaumbildung vermeiden, nicht stark schütteln!). Das verdünnte Enzym-Konjugat bei RT aufbewahren und innerhalb von 8 Stunden verwenden.
11 <input type="checkbox"/> BUF <input type="checkbox"/> WASH <input type="checkbox"/> 10x	Waschpuffer 50 mL 10-fach Waschpuffer-Konzentrat in 450 mL Laborwasser verdünnen und mischen. Der 1-fach Waschpuffer kann bis zu 7 Arbeitstage bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Start	Test-Kit aus dem Kühllager-schrank entnehmen und zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel vorbereiten
2. Proben-vorbereitung	Serumproben bei RT auftauen (siehe Kapitel: PROBEN-VORBEREITUNG); während die Proben auftauen weiter mit Durchführung Schritt 3
3. Reagenzien-vorbereitung <small>(Hinweis 1 zur Durchführung beachten)</small>	Kalibratoren und Kontrollproben rekonstituieren; Detektions-antikörper, Enzym-Konjugat und Waschpuffer ansetzen (siehe Kapitel: VORBEREITUNG DER REAGENZIEN)
4. Befüllen der Verdünnungs-platte mit Proben-verdünnungs-puffer	Probenverdünnungsplatte in den Reihen C1-12, D1-12, E1-12, F1-12, G1-12, und H1-12 entsprechend Pipettierschema unten mit Probenverdünnungs-puffer (Komponente 10) gemäß der Empfehlung der Produkt-Spezifikation befüllen

5. Probenverdünnung (Hinweise 2 und 3 zur Durchführung beachten)	Serumproben gemäß der Empfehlung der Produktspezifikation in Doppelansätzen in den vorgelegten Probenverdünnungspuffer der Verdünnungsplatte pipettieren
6. Befüllen der Verdünnungsplatte mit Kontrollproben und Kalibratoren	jeweils 150 bis 200 µL von den rekonstituierten Kontrollproben und Kalibratoren pro Kavität in die Reihen A1-12, B1-12 in die Verdünnungsplatte entsprechend dem Pipettierschema unten übertragen
7. Mischen der Probenverdünnungen	Verdünnungsplatte mit Probenverdünnungen für mindestens 30 s auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler mischen (bei 600 bis 700 rpm)
8. Transfer der Proben in die Testplatte	mit einer 8- oder 12-Kanal-Pipette jeweils 100 µL der Probenverdünnungen, Kalibratoren und Kontrollproben aus der Verdünnungsplatte spalten-oder reihenweise in die Testplatte (Komponente 1) übertragen
9. Proben-Inkubation	Testplatte mit Abdeckfolie verschließen und auf Mikrotiterplatten-Schüttler für 60 Minuten bei 600 bis 700 rpm und 25°C (oder RT) inkubieren
10. Waschen (Hinweis 4 zur Durchführung beachten)	Testplatte 4-mal mit jeweils 250 µL Waschpuffer pro Kavität waschen und auf saugfähigem Papier ausklopfen
11. Zugabe des Detektions-Antikörpers	pro Kavität 100 µL der verdünnten Detektions-Antikörper-Lösung pipettieren
12. Detektions-Antikörper-Inkubation	Testplatte mit Abdeckfolie verschließen und auf Mikrotiterplatten-Schüttler für 60 Minuten bei 600 bis 700 rpm und 25°C (oder RT) inkubieren
13. Waschen (Hinweis 4 zur Durchführung beachten)	Testplatte 4-mal mit jeweils 250 µL Waschpuffer pro Kavität waschen und auf saugfähigem Papier ausklopfen
14. Zugabe des Enzym-Konjugates	pro Kavität 100 µL der verdünnten Enzym-Konjugat-Lösung pipettieren
15. Enzym-Konjugat-Inkubation	Testplatte mit Abdeckfolie verschließen und auf Mikrotiterplatten-Schüttler für 60 Minuten bei 600 bis 700 rpm und 25°C (oder RT) inkubieren
16. Waschen (Hinweis 4 zur Durchführung beachten)	Testplatte 4-mal mit jeweils 250 µL Waschpuffer pro Kavität waschen und auf saugfähigem Papier ausklopfen

17. TMB-Substrat-Zugabe	pro Kavität 100 µL TMB-Substrat-Lösung (Komponente 12) pipettieren
18. TMB-Substrat-Inkubation	Testplatte mit Folie verschließen und lichtgeschützt! (ggf. mit Alufolie abdecken) auf Mikrotiterplatten-Schüttler für 60 Minuten bei 600 bis 700 rpm und 25°C (oder RT) inkubieren
19. Stop (Gebrauchshinweise beachten!)	pro Kavität 100 µL Stop-Lösung (Komponente 13) dazugeben und kurz auf Mikrotiterplatten-Schüttler vermischen
20. Lichtabsorptionsmessung bei 450 nm	innerhalb von 15 min nach Zugabe der Stop-Lösung die Absorption des entstandenen gelben Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer messen

Beispiel - Pipettierschema Verdünnungs-/ Test-Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CON L	CON M	CON H	CON B	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	CAL 6	CAL 7	CAL 8
B	CON L	CON M	CON H	CON B	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	CAL 6	CAL 7	CAL 8
C	P1	P2								
D	P1	P2								
E										
F										
G												
H												

Legende: CON L, M, H = Kontrollproben L, M, H
 CON B = Leerwertkontrolle
 CAL1-8 = Kalibrator 1 bis 8
 P1, P2, ... = Serumproben

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

- 1 Reagenzien von unterschiedlichen Kit-Chargen dürfen nicht gemischt verwendet werden, weil die Komponenten einer Kit-Charge aufeinander abgestimmt wurden, um eine hohe Reproduzierbarkeit und optimale Test-Leistungsfähigkeit zu gewährleisten. Reagenzien verschiedener Kits der gleichen Charge können innerhalb des angegebenen Haltbarkeitsdatums gemischt werden.
- 2 Die hohen Analyten-Konzentrationen in Serum machen eine Probenverdünnung vor Analyse im Selenotest ELISA notwendig. Die Art der Probenverdünnung hat aufgrund des geringen verwendeten Probenvolumens großen Einfluss auf die Richtigkeit der Analyse. Die Probe sollte direkt durch einmaliges Aufnehmen und Abgeben pipettiert werden. Für jede Probe sollte eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden. Die Pipettenspitze sollte nicht mit der Probe vorbenetzt werden und nach Abgabe der Probe nicht durch Aufnehmen und Abgeben von Probenverdünnungspuffer ausgespült werden.

- 3 Die Probenverdünnungen dürfen nicht direkt in der Testplatte vorgenommen werden. Es sollte eine Verdünnungsplatte aus Polypropylen oder anderem Material mit geringer Proteinbindung verwendet werden. Auch die Kalibrator- und Kontrollproben sollten in die Verdünnungsplatte pipettiert werden. Mit einer 8- oder 12-Kanal-Pipette werden dann 100 µL der Probenverdünnungen, Kalibratoren, Kontrollen von der Verdünnungsplatte in die Testplatte transferiert. So wird eine gleichmäßige Inkubationszeit für jede Probe pro Kavität sichergestellt.
Zeitliche Unterbrechungen beim Transfer der Probenverdünnungen in die Testplatte oder beim Dispensieren von Reagenzien in die Testplatte sollten vermieden werden.
- 4 Die Waschschrte (siehe Durchführung Schritte 10, 13, 16) zwischen den Inkubationsschritten können manuell mit einer 8- oder 12-Kanalpipette oder einem 8- oder 12-Kanal-Dispenser oder automatisch mit einem 8- oder 96-Kanal-Mikrotiterplatten-Wascher durchgeführt werden. Beim manuellen Waschen werden alle Kavitäten der Testplatte mit Waschpuffer befüllt und kurz darauf der Waschpuffer über einem Waschbecken oder einer Auffangschale ausgeschüttet und die Testplatte vor dem erneuten Befüllen auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Beim Waschen der Platten mit einem Mikrotiterplatten-Wascher wird die Mikrotiterplatte nur nach dem jeweils letzten Waschschrte auf saugfähigem Papier ausgeklopft.
- 5 In jeder Testplatte müssen Standards und Kontrollen mitgeführt werden. Die Auswertung mit Hilfe der Standardkurve einer anderen Testplatte ist nicht möglich, weil jede Testplatte in Abhängigkeit vom jeweiligen Bearbeiter, der tatsächlichen Inkubationstemperatur und Inkubationszeit, den angesetzten Reagenzarbeitslösungen und pipettierten Reagenzvolumen, eine eigene Signalentwicklungs- und Leistungscharakteristik aufweist.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Für die Doppelwerte der gemessenen Absorptionen der Kalibratoren, Kontroll- und Serumproben einer Testplatte werden die Mittelwerte gebildet. Die Kontrollprobe B ist nur eine Leerwertkontrolle und darf nicht von den Messwerten subtrahiert werden.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt mit einer 4- oder 5-Parameter-Logistik-Log-Funktion mit Hilfe einer Statistik-Software.

Die Selenoprotein P Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollproben sind Test-Kit-Chargen-spezifisch und können der jeweiligen Produkt-Spezifikation entnommen werden.

Die erhaltenen Selenoprotein P Konzentrationen müssen mit dem Probenverdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Selenoprotein P Konzentration des unverdünnten Serums zu erhalten.

Wenn die erhaltenen Selenoprotein P Konzentrationen außerhalb des in der Produkt-Spezifikation angegebenen Quantifizierungsbereichs liegen, muss bei einer erneuten Analyse die Probe mehr oder auch weniger in Probenverdünnungspuffer (Komponente 10) verdünnt werden. Serumproben müssen aber mindestens 1:8 in Probenverdünnungspuffer für die Analyse im Selenotest ELISA vorverdünnt werden. Der optimale Probenverdünnungsbereich liegt zwischen 1:20 bis 1:60.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Für jede Testplatte sollte nach der Auswertung die Richtigkeit der Kurvenanpassung anhand der ermittelten Selenoprotein P Konzentrationen der Kontrollproben und der zurückgerechneten Selenoprotein P Konzentrationen der Kalibratoren überprüft werden.

Die erhaltenen Selenoprotein P Konzentrationen müssen innerhalb des auf dem Produkt-Zertifikat angegeben gültigen Wertebereichs liegen.

Die im Test-Kit enthaltenen Kontrollproben dienen ausschließlich der Überprüfung der Richtigkeit der Standardkurve.

Die laborinterne Qualitätssicherung sollte über Serum-Kontrollproben erfolgen, die zusätzlich zu den analysierten Proben in jeder Testplatte mitgeführt werden und in der Zusammensetzung ähnlich den analysierten Proben sind.

Die Konzentrationen der Kontrollproben sollten Labor- und Kit-Chargen-unabhängig in einem Bereich von $\pm 30\%$ wiedergefunden werden.

Die relative Standardabweichung der Doppelwerte der Serumproben darf max. 15% betragen, sonst ist von einem Probenverdünnungsfehler auszugehen und die Messung sollte wiederholt werden.

Die laborinterne Qualitätssicherung sollte sich an den Vorgaben der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen, Teile A und B1, orientieren [11].

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die Kit-Kartonverpackung kann mit dem AVV-Abfallschlüssel 15 01 01 der Wertstoffentsorgung und -Wiedergewinnung zugeführt werden.

Die Folienverbundverpackung der Testplatte kann mit dem AVV-Abfallschlüssel 15 01 05 der Wertstoffentsorgung und -Wiedergewinnung zugeführt werden.

Alle Kit-Komponenten-Verpackungen können gereinigt als Plastikverpackungen mit dem AVV-Abfallschlüssel 15 01 02 entsorgt oder der Wertstoffwiedergewinnung zugeführt werden.

Die entwickelte Testplatte, Testkomponentenreste oder chemikalienverunreinigte Verpackungen sollten entsprechend der jeweiligen laborinternen Vorschriften für die Entsorgung von ungefährlichen Chemikalienabfällen mit dem AVV-Abfallschlüssel 18 01 06 entsorgt werden.








ÄNDERUNGEN GEGENÜBER DER VORHERIGEN VERSION DES SELENOTEST ELISA

- 1 CE-Kennzeichnung des Test-Kits
- 2 Änderung der Produkt- und Komponentenkennzeichnung
- 3 Der Waschpuffer wird als 10-fach Konzentrat, statt als 20-fach Konzentrat geliefert.















ÄNDERUNGEN GEGENÜBER DER VORHERIGEN ÜBERARBEITUNG DER ARBEITSANLEITUNG

- 1 Korrektur, Aktualisierungen und Ergänzungen in allen Kapiteln.

VERWENDETE SYMBOLE GEMÄß DIN EN ISO 15223-1

	CE-Kennzeichnung
	Chargennummer
	Bestellnummer
	Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller
	Temperaturbegrenzung
	Verwendbar bis

SONSTIGE VERWENDETE SYMBOLE GEMÄß EDMA RICHTLINIEN

	Antikörper
	Kalibrator (Standard)
	Puffer
	Inhalt (Volumen, Gewicht)
	Kontrolle
	Konjugat
	Verdünnungsmittel
	Enzym
	Menge
	Wiederherstellen mit
	Lösung
	Festphase
	Substrat
	Probe

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

4-PL	4-Parameter Logistik-Log-Funktion
5-PL	5-Parameter Logistik-Log-Funktion
AVV	Abfallverzeichnis-Verordnung
CE	EG-Zeichen
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDMA	European Diagnostic Manufacturers Association
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HBsAg	Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	menschliches Immunschwäche-Virus
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ISO	Internationale Organisation für Normung
LLOD	untere Detektionsgrenze
LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze
NIST	National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce

POD	Peroxidase
RE	relativer Fehler
RNA	Ribonukleinsäure
RSD	relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur (Umgebungstemperatur, 20°C bis 28°C)
SELENOP	Selenoprotein P (auch: SeP, SEPP1, SELP), siehe [12]
SRM	Standardreferenzmaterial
Stk.	Stück
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
ULOD	obere Detektionsgrenze
ULOQ	obere Quantifizierungsgrenze

LITERATUR

- [1] HYBSIER, S., T. SCHULZ, Z. WU, I. DEMUTH, W.B. MINICH, K. RENKO, E. RIJNTJES, J. KÖHRLE, C.J. STRASBURGER, E. STEINHAGEN-THIESSEN and L. SCHOMBURG. Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biology*. 2017, **11**, 403-414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.025>
- [2] HYBSIER, S., Z. WU, T. SCHULZ, C.J. STRASBURGER, J. KÖHRLE, W.B. MINICH and L. SCHOMBURG. Establishment and characterization of a new ELISA for selenoprotein P. *Perspectives in Science*. 2015, **3** (1–4), 23-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2014.11.013>
- [3] BURK R.F. and K.E. HILL. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2009, **1790** (11), 1441-1447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.026>
- [4] PHINNEY K.W., ET AL. Development of a Standard Reference Material for metabolomics research. *Anal Chem*. 2013, **85** (24), 11732-11738. <http://dx.doi.org/10.1021/ac402689t>
- [5] BALLIHAUT G., L.E. KILPATRICK, E.L. KILPATRICK and W.C. DAVIS. Multiple forms of selenoprotein P in a candidate human plasma standard reference material. *Metallomics*. 2012, **4** (6), 533-538. <http://dx.doi.org/10.1039/C2MT20059G>
- [6] BALLIHAUT G., L.E. KILPATRICK and W.C. DAVIS. Detection, identification, and quantification of selenoproteins in a candidate human plasma standard reference material. *Anal Chem*. 2011, **83** (22), 8667-8674. <http://dx.doi.org/10.1021/ac2021147>
- [7] JAPAN MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development. January 2014. http://www.nihs.go.jp/drug/BMV/BMV-LBA_draft_140124_E_rev.pdf
- [8] US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FDA, CDER AND CVM. Guidance for the Industry: Bioanalytical Method Validation. Draft Guidance. September 2013. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107>

[9] INTERNATIONAL CONFERENCE OF HARMONIZATION (ICH) OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). 2005
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

[10] DESILVA B., W. SMITH, R. WEINER, M. KELLEY, J. SMOLEC, B. LEE, M. KHAN, R. TACEY, H. HILL and A. CELNIKER. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res.* 2003, **20** (11), 1885-1900.
<http://dx.doi.org/10.1023/B:PHAM.0000003390.51761.3d>

[11] Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt.* 2014, **111** (38), A1583-A1618.
<http://www.bundesaerztekammer.de/aerzte/qualitaetssicherung/richtlinien-leitlinien-empfehlungen-zur-qualitaetssicherung/labor/>

[12] GLADYSHEV V.N., et al. Selenoprotein Gene Nomenclature. *J Biol Chem.* 2016, **291**(46), 24036-24040.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.756155>

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Wenn Sie weitere Informationen benötigen, Fragen oder Hinweise zum Selenotest ELISA haben, dann wenden Sie sich bitte an:

InVivo BioTech Services GmbH
E-Mail: selenotest@ici-diagnostics.com
Telefon: +49 (0)30 6120 1765

Diese Anleitung ist als Download verfügbar unter:
<http://www.ici-diagnostics.com/products/selenotest-elisa/>