

Synovasure® Alpha Defensin ELISA-Test

Zur *In-vitro*-Diagnostik

- **Benutzer müssen diese Packungsbeilage vollständig lesen, bevor sie das Produkt verwenden. Befolgen Sie bei der Durchführung des Tests sorgfältig die Anweisungen. Andernfalls können ungenaue Testergebnisse die Folge sein.**

CD2000-10 Synovasure® Alpha Defensin ELISA-Test



EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieser Test wurde nicht für die Verwendung bei Patientenpopulationen ohne totalen Gelenkersatz validiert.

NAME UND VERWENDUNGSZWECK

Der Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test ist ein qualitativer, visuell abzulesender immunchromatografischer Test zum Nachweis von humanen Wirtsantwortproteinen, den Alpha Defensinen 1–3, in der Gelenkflüssigkeit von Erwachsenen mit totalem Gelenkersatz, bei denen die Notwendigkeit einer Revisionsoperation ermittelt wird. Die Ergebnisse des Synovasure Alpha Defensin ELISA-Tests sind zum Einsatz in Verbindung mit anderen klinischen und diagnostischen Befunden bestimmt, um die Diagnose einer periprotetischen Gelenkinfektion (PJI) zu unterstützen. Der Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test ist nicht zur Bestimmung der Ätiologie bzw. der Schwere einer PJI vorgesehen. Das Produkt ist nicht automatisiert.

Der Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test ist nur für die Verwendung in einem klinischen Labor durch qualifiziertes Personal vorgesehen.

GRUNDLAGEN DES TESTS

Der Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test ist ein immunometrischer Test, bei dem die in der Probe vorhandenen Alpha-Defensin-1–3-Peptide mit einem monoklonalen Anti-Alpha-Defensin-Antikörper reagieren, der auf die Wells aufgetragen wird. Vor der Verwendung im Test werden die Proben der Gelenkflüssigkeit 10 Minuten lang bei 1000 G zentrifugiert, um zelluläres Material zu entfernen. Die Proben werden dann 1:8.000 in Testverdünnungsmittel verdünnt und in eine Mikrotiterplatte übertragen, die mit Anti-Defensin beschichtet ist. Nach der Inkubation werden ungebundene Materialien durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein biotinyliertes Antikörperkonjugat (von Mäusen stammendes monoklonales Anti-Alpha-Defensin) hinzugefügt, das sich mit dem gebundenen Alpha-Defensin verbindet.

Nach einem weiteren Waschschritt wird ein Streptavidin-(Meerrettich)-Peroxidase-(SA-HRP)-Konjugat hinzugefügt, das mit dem gebundenen biotinylierten Antikörperkonjugat einen Komplex bildet. Ungebundene Materialien werden durch Waschen entfernt. Das gebundene SA-HRP-Konjugat wird durch eine kolorimetrische Reaktion gemessen. Ein Substrat, das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, wird in die Wells gegeben. Der SA-HRP im gebundenen Konjugat katalysiert die Oxidation des TMB-Substrats und erzeugt ein farbiges Produkt. Die Farbbildung wird nach 30 Minuten durch Zugabe von Maleinsäure in die Wells gestoppt und durch Ablesen der optischen Dichte bei 450 nm gemessen. Die Menge des gebundenen SA-HRP-Konjugats ist proportional zur Konzentration der vorhandenen Alpha-Defensine 1–3.

Die Ergebnisse werden als normalisiertes Signal im Verhältnis zu einem Cutoff-Wert berechnet.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Zur *In-vitro*-Diagnostik

- **Dieses Kit darf nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden.**
- **Für die Herstellung des Waschpuffers und des Testpuffers und die Rehydrierung des Kalibrators und der Kontrollen muss destilliertes oder deionisiertes Wasser verwendet werden. Wasser für klinische Laborreagenzien vom Typ I oder Typ II ist akzeptabel. Lagern Sie das Wasser in nichtmetallischen Behältern.**
- **Mischen Sie keine Chargennummern von beschichteten Mikrotiterplatten, Testverdünnungsmittel, Konjugatreagenzien, Kalibratoren oder Kontrollen aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern.**

- Die Mikrotiterstreifen sind in Schutzbeuteln mit Trockenmittel versiegelt. Wenn das Trockenmittel fehlt, dürfen die Mikrotiterstreifen nicht verwendet werden. Achten Sie beim Wiederverschließen des Folienbeutels darauf, das Trockenmittel mit einzuschließen.
- Kreuzkontamination zwischen Reagenzien führt zur Ungültigkeit der Testergebnisse. Es wird empfohlen, gekennzeichnete, speziell für die entsprechenden Reagenzien vorgesehene Behälter zu verwenden.
- Stellen Sie sicher, dass die Probe richtig verdünnt und in die Mikrowells gegeben wird. Wenn eine Probe nicht verdünnt wird, kann dies zu einem falschen Infektionsergebnis führen. Wenn keine Probe hinzugefügt wird, kann dies zu einem fehlerhaften aseptischen Ergebnis führen.
- Bei Verwendung einer Einkanal-Mikropipette für die manuelle Probenzugabe verwenden Sie für jede zu untersuchende Probe eine neue Pipettenspitze. Bei Verwendung einer Mehrkanal-Mikropipette sind für jedes hinzuzufügende Reagenz neue Spitzen zu verwenden.
- Die strikte Einhaltung des angegebenen Waschverfahrens ist für eine optimale Leistung des Tests von entscheidender Bedeutung. (Siehe Schritt 7 unter „Testverfahren“.)
- Berühren Sie nicht die untere Außenfläche der Mikro-Wells. Fingerabdrücke oder Kratzer können das Ablesen der Mikro-Wells beeinträchtigen.
- Achten Sie darauf, dass die Mikrotiterstreifen während des Testverfahrens in der Mikrotiterstreifen-Halterung eben aufliegen. Falls erforderlich, wischen Sie den Boden der Mikrotiterstreifen vor dem Ablesen vorsichtig mit einem weichen, fusselfreien, saugfähigen Tuch ab, um Feuchtigkeit, Staub oder Schmutz zu entfernen.
- Kontrollwerte, die nicht im erwarteten Bereich liegen (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“), können auf ein technisches Problem oder eine Beeinträchtigung des Produkts hinweisen.
- Alle Pipettiergeräte müssen mit Vorsicht verwendet, regelmäßig kalibriert und gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers gewartet werden.
- Verzögerungen bei der Plattenverarbeitung können die Absorptionswerte beeinflussen.
- Der Test muss bei Raumtemperatur (15–30 °C) durchgeführt werden; außerhalb dieses Bereichs darf er nicht durchgeführt werden.
- Öffnen Sie Glasfläschchen vorsichtig: Die Fläschchen stehen unter Vakuum.
- Vor der Verwendung müssen die Reagenzien einer Sichtprüfung auf Farbveränderungen, Trübungen und Ausfällungen unterzogen werden.
- Verwenden Sie das Produkt nicht, wenn Komponenten beschädigt sind.

Sicherheitsmaßnahmen

- Tragen Sie beim Umgang mit den Kit-Reagenzien und Proben Einweghandschuhe. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
- Verschlucken oder inhalieren Sie keine der Komponenten des Kits.
- Das Synovasure Alpha Defensin ELISA-Testkit enthält MIT (ProClin 950 oder StabilZyme) und die Stopplösung enthält Maleinsäure. Direkter Kontakt mit Haut und Augen muss unbedingt vermieden werden. Bei Kontakt sofort mit viel Wasser abspülen und einen Arzt aufsuchen. **EU-Gefahrencode: Xn; Sensibilisierend. Risikohinweis: 34. CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 Gefahrenhinweis H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.**
- Behandeln Sie die Komponenten des Kits sowie alle biologischen Proben und Testmaterialien unter Anwendung der allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen, da sie potenziell gefährlich und potenziell infektiös sind.
- Entsorgen Sie alle Proben und Materialien, die zur Durchführung des Tests verwendet wurden, so, als ob sie infektiöse Erreger enthielten. Die Entsorgung aller Proben und Materialien muss allen örtlich, im jeweiligen Bundesland und auf Bundesebene geltenden Abfallentsorgungsvorschriften entsprechen.

Einschränkungen des Verfahrens

- **Bekannte Störfaktoren**
 - Proben mit starker Hämolyse können zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- **Weitere Einschränkungen**

Das Vorhandensein von Alpha-Defensin in der Gelenkflüssigkeit stellt keine Diagnose einer PJI dar, kann jedoch auf eine kürzlich aufgetretene und/oder zurückliegende Infektion hinweisen. Ein aseptisches Testergebnis schließt die Möglichkeit einer PJI nicht aus. Die Konzentration von Alpha-Defensin kann bei einer frühen Infektion möglicherweise nicht nachweisbar sein.
- Die Ergebnisse dieses Produkts dürfen nur in Verbindung mit Informationen verwendet werden, die aus klinischen Bewertungen und anderen Tests zur Diagnose einer periprotetischen Gelenkinfektion stammen.

BEREITGESTELLTE MATERIALIEN UND LAGERBEDINGUNGEN

Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test Artikelnummer CD2000-10

Lagern Sie das ungeöffnete Kit im Kühlschrank (2–8 °C). Lagern Sie den Waschpuffer bei Raumtemperatur (15–30 °C). Verwenden Sie keine Kits, deren Verfallsdatum abgelaufen ist. Die Verfallsdaten sind auf den Etiketten der Kits und Fläschchen angegeben. Weitere Informationen zu Materialien und Lagerbedingungen finden Sie in Tabelle 1.

HINWEIS: Der Waschpuffer wird außerhalb des Kits geliefert, um die Lagerung zu erleichtern.

Tabelle 1: Bereitgestellte Materialien und Lagerbedingungen

Kit-Komponente	Artikel- nummer REF	Menge QTY	Lagerung und „Haltbarkeitsdatum“ von geöffneten/rekonstituierten/verdünnten Materialien
Alpha-Defensin-beschichtete Mikrotiterplatten – 12 Streifen pro Platte (insgesamt 96 Mikro-Wells pro Platte), versiegelt in einem wiederverschließbaren Folienbeutel mit Trockenmittel	P50000	10 Platten	Legen Sie nicht verwendete Wells wieder in den wiederverschließbaren Folienbeutel mit dem Trockenmittel. Versiegeln Sie den Beutel wieder mit dem Reißverschluss entlang der gesamten Kante. Gekühlt lagern. Kann bis zu vier (4) Wochen lang verwendet werden.
Qualitätskontrolle 1 (QC1), Alpha-Defensin – 0,25 ml synthetische Gelenkflüssigkeit, Glasfläschchen	P50002	10 Fläschchen	Gekühlt lagern. Rehydriert: Kappe wieder anbringen. Kann bis zu 2 Wochen lang verwendet werden.
Qualitätskontrolle 2 (QC2), Alpha-Defensin – 0,25 ml mit 4 µg/ml in synthetischer Gelenkflüssigkeit, Glasfläschchen	P50003	10 Fläschchen	
Qualitätskontrolle 3 (QC3), Alpha-Defensin – 0,25 ml mit 12 µg/ml in synthetischer Gelenkflüssigkeit, Glasfläschchen	P50004	10 Fläschchen	
Kalibrator, Alpha-Defensin – 0,25 ml in synthetischer Gelenkflüssigkeit, Glasfläschchen	P50005	10 Fläschchen	
Biotin-Konjugat, lyophilisiert – 0,25 ml 100-faches Konzentrat, Glasfläschchen	P50001	10 Fläschchen	Gekühlt lagern. Rehydriert: Kappe wieder anbringen. Kann bis zu zwei (2) Wochen lang verwendet werden. Verdünnt: Kann bis zu zwei (2) Wochen lang verwendet werden.
Streptavidin-Peroxidase (SA-HRP)-Konjugat – 60 ml, braune Flasche	P50011	3 Flaschen	Gekühlt lagern. Nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwenden.
Testverdünnungsmittel – 500 ml 5-faches Konzentrat, undurchsichtige Flasche	P50009	1 Flasche	Gekühlt lagern. Konzentrat: Nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwenden. Verdünnt: Kann bis zu vier (4) Wochen lang verwendet werden.
Waschpuffer – 1000 ml 10-faches Konzentrat, undurchsichtige Flasche	P50010	1 Flasche	Bei Raumtemperatur lagern Konzentrat: Nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwenden. Verdünnt: Kann bis zu vier (4) Wochen lang verwendet werden.
TMB-Lösung (Farbstoff) – 60 ml, braune Flasche	P50012	3 Flaschen	Gekühlt lagern. Nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwenden.
Stopplösung – 250 ml, undurchsichtige Flasche	P50013	1 Flasche	Gekühlt lagern. Nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwenden.
Gebrauchsanweisung		1	

WEITERE ERFORDERLICHE, ABER NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

- Präzisions-Pipetten mit positiver Verdrängung für die Probenvorbereitung
- Pipetten zur Abgabe von 100–1000 µl
- Polypropylenröhrchen
- Plattenversiegelungen
- Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikroplatten-Lesegerät, das die Absorption bei 450 nm messen kann
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Polypropylen-Transferplatte
- Zentrifuge
- Pipettenbecken
- Unbeschichtete ELISA-Teststreifen von Costar-Mikroplatten
- Aluminiumfolie
- Feuchttücher für empfindliche Anwendungen (Kimtech Science Kimwipes SKU 34155 oder gleichwertig)

ENTNAHME, VORBEREITUNG UND LAGERUNG VON PROBEN

Empfohlene Proben

Aus dem Gelenk abgesaugte Gelenkflüssigkeit.

Nicht empfohlene Proben

Blut, Serum/Plasma oder modifizierte Gelenkflüssigkeit etwa durch Spülen mit Kochsalzlösung oder unmittelbar nach der Injektion entnommene Flüssigkeit beeinflussen die Leistung des Tests.

Probenentnahme und -vorbereitung

Die Gelenkflüssigkeit muss mit zugelassenen medizinischen Techniken durch Aspiration der Gelenkflüssigkeit mit einer Polypropylenspritze entnommen und in ein steriles Röhrchen aus Polyethylenterephthalat (PET) ohne Zusätze (z. B. Röhrchen mit klarem Deckel und rotem Stopfen) transferiert werden. Die Proben müssen vor der Verarbeitung im Test 10 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert werden. Die Proben müssen so schnell wie möglich nach der Entnahme getestet werden. Verwenden Sie keine wärmebehandelten Proben.

Starke Hämolyse in Gelenkflüssigkeitsproben, die während der Probenentnahme mit Blut kontaminiert wurden, kann zu einem Anstieg des Alpha-Defensin-Spiegels führen. Hämolyse muss bei der Übermittlung eines Ergebnisses vermerkt und gemeldet werden.

Bedingungen für die Handhabung und Lagerung von Proben

Die Verarbeitung der Proben zum Entfernen des Zellmaterials muss so schnell wie möglich erfolgen. Die Proben können bis zu 3–4 Tage bei 2–8 °C gelagert werden.

TESTVERFAHREN

Die Testdauer beträgt in der Regel 3–4 Stunden.

Vorbereitung der Reagenzien

Lassen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (15–30 °C) kommen.

Lagern Sie das Produkt nach Gebrauch sofort wieder unter geeigneten Bedingungen.

- **Handhabung des Kalibrators**
Der Kalibrator wird lyophilisiert geliefert und muss mit 250 µl (0,25 ml) deionisiertem Wasser rehydriert werden. Gründlich mit einem Vortex-Mischer mischen. 10 Minuten stehen lassen. Stellen Sie vor der Verwendung sicher, dass sich keine Blasen im Kalibrator befinden.
- **Handhabung der Kontrollen**
Die Kontrollen werden lyophilisiert geliefert und müssen mit 250 µl (0,25 ml) deionisiertem Wasser rehydriert werden. Gründlich mit einem Vortex-Mischer mischen. 10 Minuten stehen lassen. Stellen Sie vor der Verwendung sicher, dass sich keine Blasen im Kalibrator befinden.
- **Waschpuffer**
Der Waschpuffer wird als 10-faches Konzentrat geliefert und muss vor der Verwendung auf 1-fach verdünnt werden. Vorbereitung des Waschpuffers (1-fach): Mischen Sie 100 ml 10-faches Waschpufferkonzentrat mit 900 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser. Notieren Sie das Datum, an dem der Waschpuffer (1-fach) zubereitet wurde, und das Verfallsdatum auf dem Behälter. Entsorgen Sie den Waschpuffer (1-fach), wenn er sichtbar verunreinigt ist.

Hinweis: Das Waschpufferkonzentrat kann Kristalle enthalten, wenn die Temperatur unter 15 °C fällt. Bringen Sie das Konzentrat vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur. Mischen Sie das Konzentrat vor der Verwendung gründlich durch. Stellen Sie sicher, dass sich die Kristalle vor der Verwendung aufgelöst haben.

- **Testverdünnungsmittel**
Das Testverdünnungsmittel wird als 5-faches Konzentrat geliefert und muss vor der Verwendung auf 1-fach verdünnt werden. Bereiten Sie das Testverdünnungsmittel zu, indem Sie 40 ml des 5-fachen Testverdünnungsmittels mit 160 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser mischen. Diese Menge reicht für 2 x 96 Tests. Falls weniger Volumen benötigt wird, bereiten Sie das gewünschte Volumen des Verdünnungspuffers zu, indem Sie 1 Teil des 5-fachen Verdünnungspuffers mit 4 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Notieren Sie das Datum, an dem das Testverdünnungsmittel (1-fach) zubereitet wurde, und das Verfallsdatum auf dem Behälter.
- **Biotin-Konjugat**
Das Biotin-Konjugat wird als lyophilisiertes und unter Vakuum versiegeltes 100-faches Konzentrat geliefert. Vor Gebrauch auf 1-fach verdünnen. Entfernen Sie vorsichtig die Kappe und rekonstituieren Sie das Konjugat, indem Sie 0,25 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser in das Fläschchen pipettieren. Verdünnen Sie das rekonstituierte Konjugat 1:100 mit 1-fachem Testverdünnungsmittel. Notieren Sie das Datum der Zubereitung und das Verfallsdatum auf dem Behälter des 1-fachen Konjugats. Notieren Sie das Datum der Rekonstituierung und das Verfallsdatum auf dem Fläschchen des 100-fachen Konjugats.
- **Streptavidin-Peroxidase-Konjugat**
Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wird gebrauchsfertig geliefert.
- **TMB-/Stopplösung**
Das TMB-Substrat und die Stopplösung werden beide gebrauchsfertig geliefert.

SYNOVASURE ALPHA DEFENSIN ELISA-TEST – TESTVERFAHREN

Kalibrator, Qualitätskontrollen und Proben müssen wie folgt auf eine Endverdünnung von 1:8.000 verdünnt werden:

Tabelle 2: Probenvorbereitung und Verdünnungsfaktor

Schritt	Probenvorbereitung	Verdünnungsfaktor
1	50 µl der Probe in 950 µl Testverdünnungsmittel	1:20
2	50 µl der Probe, 1:20 (Schritt 1) verdünnt, in 950 µl Testverdünnungsmittel	1:400
3	50 µl der Probe, 1:400 (Schritt 2) verdünnt, in 950 µl Testverdünnungsmittel	1:8.000

Verdünnte Proben müssen bei jedem Schritt gut gemischt werden. Es wird empfohlen, beim Abfüllen von Gelenkflüssigkeit eine Pipette mit positiver Verdrängung zu verwenden, da es sich in der Regel um viskoses Material handelt.

1. Bereiten Sie vor Beginn des Verfahrens alle Reagenzien wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben vor und bringen Sie alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C). Verdünnte Proben und Reagenzien vor der Verwendung durch vorsichtiges mehrmaliges Umdrehen mischen, kräftiges Schütteln und Schaumbildung jedoch vermeiden.
2. Ermitteln Sie die Gesamtzahl der für den Test benötigten Wells. Zusätzlich zu den Proben werden auf jeder Platte oder Teilplatte ein Kalibrator und drei Kontrollen enthalten sein. Es wird empfohlen, Proben, Kalibratoren und Kontrollen doppelt zu testen. Notieren Sie das Datum, an dem der Beutel geöffnet wurde, und das Verfallsdatum der nicht verwendeten Wells auf dem Beutel.

ACHTUNG: Gehen Sie mit den Mikrotiterstreifen vorsichtig um. Berühren Sie nicht die untere Außenfläche der Wells.

3. Setzen Sie die Mikrotiterstreifen in die Mikrotiterstreifen-Halterung ein, falls erforderlich. Die Mikrotiterstreifen müssen in der Mikrotiterstreifen-Halterung eben aufliegen.
4. Erstellen Sie eine Aufzeichnung (Plattenkarte), in der die Platzierung der Kontrollen und Proben in den Mikro-Wells angegeben ist.
5. Vergewissern Sie sich, dass alle manuellen Dosiergeräte so eingestellt sind, dass sie die im Verfahren angegebenen Volumina gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers abgeben. Geben Sie 100 µl des verdünnten Kalibrators, der Kontrollen und Proben mit einer Mikropipette, die 100 µl mit einer Genauigkeit von mindestens ± 5 % abgeben kann, in die Mikro-Wells.
6. Decken Sie die Mikrotiterstreifen-Halterung mit einer Plattenversiegelung ab. Bei Raumtemperatur 60 Minuten ± 5 Minuten inkubieren.
7. Mit einem Gerät zum Aspirieren und Waschen alle Wells viermal mit vorbereitetem 1-fachem Waschpuffer aspirieren und waschen.

ACHTUNG: Die genaue Einhaltung des angegebenen Waschverfahrens ist für die optimale Leistung des Tests von entscheidender Bedeutung.

Befolgen Sie die angegebenen Schritte, damit ein gründliches Waschen gewährleistet ist:

- a. Aspirieren Sie die Probenlösungen aus den Mikro-Wells und füllen Sie die Wells dann vollständig mit Waschpuffer. Lassen Sie die Wells nicht überlaufen.
 - b. Führen Sie die Aspirations-/Füllsequenz drei weitere Male durch.
 - c. Aspirieren Sie die Wells vollständig. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie bei Bedarf auf einem sauberen Papiertuch aus, um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen.
8. Geben Sie 100 µl des biotinylierten Antikörperkonjugats in alle Wells. Verwenden Sie dazu eine einstellbare Mehrkanal-Mikropipette oder einen gleichwertigen Reagenzienverteiler, der 100 µl mit einer Genauigkeit von mindestens ± 5 % abgeben kann.
 9. Decken Sie die Mikrotiterstreifen-Halterung mit einer neuen, unbenutzten Plattenversiegelung ab. Bei Raumtemperatur 30 Minuten ± 3 Minuten inkubieren.
 10. Waschen Sie die Wells nach der zweiten Inkubation wie in Schritt 7 beschrieben.
 11. Geben Sie 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in alle Wells. Verwenden Sie dazu eine einstellbare Mehrkanal-Mikropipette oder einen gleichwertigen Reagenzienverteiler, der 100 µl mit einer Genauigkeit von mindestens ± 5 % abgeben kann.

12. Decken Sie die Mikrotiterstreifen-Halterung mit einer neuen, unbenutzten Plattenversiegelung ab. Bei Raumtemperatur 30 Minuten $\pm$ 3 Minuten inkubieren.
13. Waschen Sie die Wells nach der dritten Inkubation wie in Schritt 7 beschrieben.
14. Geben Sie 100 μ l TMB-Lösung in alle Wells. Verwenden Sie dazu eine einstellbare Mehrkanal-Mikropipette oder einen gleichwertigen Reagenzienverteiler, der 100 μ l mit einer Genauigkeit von mindestens $\pm$ 5 % abgeben kann.
15. Bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 Minuten $\pm$ 1 Minute inkubieren.
16. Geben Sie 100 μ l Stopplösung in alle Wells. Verwenden Sie dazu eine einstellbare Mehrkanal-Mikropipette oder einen gleichwertigen Reagenzienverteiler, der 100 μ l mit einer Genauigkeit von mindestens $\pm$ 5 % abgeben kann. Falls erforderlich, klopfen Sie vorsichtig auf die Platte oder verwenden Sie einen Mikrotiterplatten-Schüttler, um den Inhalt zu mischen. Achten Sie darauf, dass der Inhalt der Mikro-Wells nicht verspritzt wird.
17. Wischen Sie bei Bedarf vor dem Ablesen vorsichtig mit einem weichen, fusselfreien, saugfähigen Tuch die Feuchtigkeit vom Boden der Mikrotiterstreifen ab. Richten Sie die Streifen bei Bedarf in der Mikrotiterstreifen-Halterung eben aus. Lesen Sie die Mikrotiterstreifen bei einer Wellenlänge von 450 nm ab.

HINWEIS: Die Mikrotiterstreifen müssen innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung abgelesen werden. Die Platten müssen bis zum Ablesen im Dunkeln gelagert werden.

KALIBRIERUNG

Der Cutoff-Wert des Synovasure Alpha Defensin ELISA-Tests basiert auf dem Vergleich von Kontrollen/Proben mit einem internen absoluten Kalibrator, dem ein absoluter Kalibrierungsfaktor zugewiesen wurde, um den optimalen Cutoff-Wert für die klinische Sensitivität und Spezifität festzulegen.

Die OD-Ergebnisse (optische Dichte) werden gemessen und relativ zu einem Cutoff-Wert normalisiert. Ein chargenspezifischer Parameter wird verwendet, um einen gültigen Cutoff-Wert für den Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test zu ermitteln.

QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Kontrolle des Synovasure Alpha Defensin ELISA-Tests sollten die drei (3) Qualitätskontrollen QC1, QC2 und QC3 verwendet werden. Die Low-Negative-Kontrolle (QC1) stellt sicher, dass der Test keine erhöhten Hintergrundwerte liefert. Die High-Negative-Kontrolle (QC2) ist so konzipiert, dass sie knapp unter dem klinischen Entscheidungspunkt liegt und sicherstellt, dass die Spezifitätsleistung unter Kontrolle ist. Die Low-Positive-Kontrolle (QC3) ist so konzipiert, dass sie knapp über dem klinischen Entscheidungspunkt liegt und sicherstellt, dass die Sensitivitätsleistung erhalten bleibt. Die akzeptablen Ergebnisse finden Sie in der folgenden Tabelle.

Tabelle 3: Akzeptanzkriterien

Parameter	Akzeptables Ergebnis (Klassifizierung)
QC1	$\leq 0,30$ (ASEPTISCH)
QC2	$\leq 0,89$ (ASEPTISCH)
QC3	$\geq 1,00$ (INFIZIERT)

Die gute Laborpraxis erfordert, dass Kontrollen durchgeführt werden, um die Leistung des Tests zu überprüfen.

Zur Gewährleistung der Leistung müssen Kontrollmaterialien auf dieselbe Weise wie Patientenproben analysiert werden. Wenn die Kontrollergebnisse außerhalb des akzeptablen Bereichs liegen, untersuchen Sie die Ursache, bevor Sie entscheiden, ob Sie die Patientenergebnisse melden.

Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisberechnung

Die Ergebnisse werden als normalisiertes Signal im Verhältnis zu einem Cutoff-Wert berechnet.

Ergebnis = OD für Testprobe / OD bei Cutoff (Cutoff-Wert).

Cutoff-Wert = OD für Kalibrator x [Chargenspezifischer Kalibratorfaktor – auf dem Analysezertifikat angegeben].

Ein Ergebnis von $\geq 1,00$ weist auf eine positive Probe und das mögliche Vorhandensein von PJI hin und kann als infiziert definiert werden.

Ein Ergebnis von $<0,90$ weist auf eine negative Probe hin und kann als aseptisch definiert werden.

Ein Ergebnis von $\geq 0,90$ und $<1,00$ weist auf eine unbestimmte Probe hin.

Eine Probe, die im Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test als „unbestimmt“ eingestuft wurde, muss zur Überprüfung ihres Status doppelt getestet werden. Wenn die Ergebnisse bei Wiederholungstests für beide Replikate $<0,90$ sind, muss die Probe als negativ betrachtet werden. Wenn eines der beiden Ergebnisse des erneuten Tests $\geq 0,90$ ist, muss die Probe durch zusätzliche Tests untersucht werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Bei wiederholt unbestimmten Ergebnissen wird eine Analyse von Folgeproben empfohlen.

Leistungsmerkmale

Klinische Diagnosegenauigkeit:

Über einen Zeitraum von 23 Monaten wurde eine prospektive und retrospektive Studie des Synovasure Alpha Defensin ELISA-Tests mit Proben von Probanden durchgeführt, die an drei US-amerikanischen Prüfbzentren entnommen wurden. Die Probanden der Studie wurden von einem unabhängigen Gremium aus drei Ärzten mit Fachkenntnissen im Bereich Infektionen anhand von MSIS-definierten Kriterien als PJI-positiv oder -negativ eingestuft. Das Gremium hatte Zugang zu allen für die klinische Diagnose erforderlichen Patientendaten (z. B. alle MSIS-Kriterien und die Patientenanamnese). Die Ergebnisse der Synovasure-PJI-Tests waren dem Gremium nicht bekannt. Insgesamt wurden 851 Probanden auf ihre Eignung für die Studie untersucht, darunter 386 prospektive Probanden, und 465 Proben wurden retrospektiv ausgewertet. Von den insgesamt 386 untersuchten prospektiven Probanden wurden 304 Probanden in die ELISA-Analyse einbezogen, während die übrigen aufgrund von Ein- und Ausschlusskriterien für Probanden/Proben von der Studie ausgeschlossen wurden. Von den 465 identifizierten retrospektiven Proben wurden 3 Proben aufgrund unzureichender Menge ausgeschlossen. Die klinische Sensitivität, klinische Spezifität, PPV und NPV für den Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test wurden durch Vergleich mit der Erkennung von PJI unter Verwendung der MSIS-Definition der PJI-Diagnose bestimmt. Für die klinische Sensitivität, die klinische Spezifität, den positiven (PPV) und den negativen Vorhersagewert (NPV) wurden Punktschätzungen und zugehörige 95%-Konfidenzintervalle (KIs) berechnet. Kategoriale Variablen wurden durch Häufigkeitsauszählungen und Prozentsätze zusammengefasst. Kontinuierliche Variablen wurden nach Anzahl der Beobachtungen (N), Sensitivität, Spezifität und 95%-KIs zusammengefasst. Das Ergebnis für den Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test wurde als „positiv“, „negativ“ oder „unbestimmt“ berichtet. Wenn ein erstes Ergebnis nicht eindeutig war, wurde die Probe erneut getestet und das Endergebnis berichtet.

Basierend auf den MSIS-Kriterien lauteten die Akzeptanzkriterien für diese Studie bei 100 PJI-positiven Proben klinische Sensitivität ≥ 90 % und klinische Spezifität ≥ 90 %. PPV und NPV wurden unter Berücksichtigung eines 95%-Konfidenzintervalls berechnet; es wurden jedoch keine vorab vereinbarten Erfolgskriterien festgelegt. Die Daten zur Leistungsrate oder zu den Werten, die die Sensitivität und Spezifität des Synovasure Alpha Defensin ELISA-Tests angeben, sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 4: Schätzungen der klinischen Leistung für alle prospektiven Probanden und retrospektiv positive Probanden

Synovasure® Alpha Defensin ELISA-Test				
		Positiv	Negativ	Gesamt
Klinische PJI-Diagnose	PJI-positiv	113	9	122
Klinische PJI-Diagnose	PJI-negativ	6	241	247
Klinische PJI-Diagnose	Gesamt	119	250	369
Sensitivität		92,6 % (113/122) (86,5 %–96,6 %)		
Spezifität		97,6 % (241/247) (94,8 %–99,1 %)		
PPV		95,0 % (113/119) (89,3 %–98,1 %)		
NPV		96,4 % (241/250) (93,3 %–98,3 %)		

KI = Konfidenzintervall; NPV = negativer Vorhersagewert; PJI = Peripröthetische Gelenkinfektion; PPV = positiver Vorhersagewert;

Tabelle 5: Schätzungen der klinischen Leistung für alle prospektiven Probanden und retrospektiv positive Probanden, ausgenommen Probanden mit Proben, bei denen die Erythrozytenzahl >1 Million Zellen/µl beträgt

Synovasure® Alpha Defensin ELISA-Test				
		Positiv	Negativ	Gesamt
Klinische PJI-Diagnose	PJI-positiv	112	6	118
Klinische PJI-Diagnose	PJI-negativ	6	228	234
Klinische PJI-Diagnose	Gesamt	118	234	352
Sensitivität		94,9 % (112/118) (89,3 %–98,1 %)		
Spezifität		97,4 % (228/234) (94,5 %–99,1 %)		
PPV		94,9 % (112/118) (89,3 %–98,1 %)		
NPV		97,4 % (228/234) (94,5 %–99,1 %)		

KI = Konfidenzintervall; NPV = negativer Vorhersagewert; PJI = Periprothetische Gelenkinfektion; PPV = positiver Vorhersagewert;

Präzision

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: Vier (4) Präzisionspools (Low-Negative, High-Negative, Low-Positive und High-Positive) wurden zweimal täglich über fünf Tage in Doppelbestimmung getestet, um die Präzision des Tests zu ermitteln.

- Pool 1 (P-1) repräsentiert eine Low-Negative-Probe mit einem Ergebnis $\leq 0,35$.
- Pool 2 (P-2) repräsentiert eine High-Negative-Probe mit einem Ergebnis zwischen 0,50 und 0,80.
- Pool 3 (P-3) repräsentiert eine Low-Positive-Probe mit einem Ergebnis zwischen 1,20 und 1,60.
- Pool 4 (P-4) repräsentiert eine High-Positive-Probe mit einem Ergebnis zwischen 2,00 und 3,00.

Der Synovasure Alpha Defensin ELISA-Test erfüllte die Akzeptanzkriterien für die Präzisionsleistung, da die Gesamtpräzision und die Präzision innerhalb der Testreihe für den High-Negative-, Low-Positive- und High-Positive-Pool ≤ 20 % betragen. Die folgenden Tabellen fassen die Studienergebnisse (Mittel, SD und %CV) aus jedem Durchlauf zusammen.

Tabelle 6: Gesamtpräzision über 5 Tage, 2 Durchläufe und 4 Pools

Pool	Probe	Mittleres Ergebnis	SD	%CV
P-1	Low-Negative	0,16	0,019	12 %
P-2	High-Negative	0,72	0,093	13 %
P-3	Low-Positive	1,30	0,082	6 %
P-4	High-Positive	2,48	0,217	9 %

Tabelle 6: Schätzung des Wiederholbarkeitsparameters

Pool	Probe	Sr*	Sr/mittleres Ergebnis
P-1	Low-Negative	0,008	5,2 %
P-2	High-Negative	0,041	5,8 %
P-3	Low-Positive	0,064	4,9 %
P-4	High-Positive	0,124	5,0 %

* Sr ist ein Wiederholbarkeitsparameter, der auf der Grundlage von CLSI EP5-A2 berechnet wird.

Die Reproduzierbarkeitsdaten werden durch die unten aufgeführte C5-C95-Studie weiter gestützt.

Erkennung in der Cutoff-Umgebung

C5-C95-Etablierungs- und Verifizierungsstudie: Eine C5-C95-Etablierungs- und Verifizierungsstudie wurde an zwei verschiedenen Standorten (CD Laboratory, Baltimore (CDL), und CD Diagnostics, Claymont (CDD)) mit drei verschiedenen Benutzern und einer Studiengruppe von insgesamt 11 Mitgliedern durchgeführt. Die Studie wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen durchgeführt, in dem drei Reagenz- und Kalibratorchargen-Kombinationen (d. h. Reagenzcharge Nr. 1/Kalibratorcharge Nr. 1, Reagenzcharge Nr. 2/Kalibratorcharge Nr. 2, Reagenzcharge Nr. 3/Kalibratorcharge Nr. 3) verwendet wurden. Die Tests wurden an einem Panel von 88 Proben von drei Benutzern (einem für jede Chargenkombination) durchgeführt, davon zwei am CDL und einer bei CDD. Für jede Charge wurde jedes Panel von einem Benutzer innerhalb eines Durchlaufs pro Tag getestet, was insgesamt 120 Replikate pro Probe ergab (5–11 Replikate/Durchlauf x 1 Durchlauf/Tag x 5 Tage/Standort x 3 Chargen).

Zur Verifizierung des C5-C95-Bereichs wurde am CDL und bei CDD eine eintägige Studie durchgeführt, bei der drei Reagenz- und Kalibratorchargen-Kombinationen verwendet wurden. Der Teststandort wurde mit 3 Sätzen C5/C95 ausgestattet. Die in den Tests verwendeten Studienpanels bestanden aus 20 Replikaten von 11 Gruppenmitgliedern, welche die erwarteten C5-C95-Bereiche des Tests abdeckten, was insgesamt 220 verblindeten Proben pro Benutzer entsprach. Mit drei Benutzern, darunter zwei am CDL und einer bei CDD, wurden insgesamt 60 Bestimmungen für jedes Gruppenmitglied für insgesamt 660 verblindete Proben unter den 11 Gruppenmitgliedern durchgeführt. Jedes Panel wurde für die Prüfung auf einer bestimmten Testcharge und in einem bestimmten Testdurchlauf gekennzeichnet (z. B. L1/R1; L2/R2).

Die S/CO-Daten für C5, C50 und C95 (vorhergesagt 0,69 bei 5 %, 1,01 bei 50 % und 1,48 bei 95 %) aus der Etablierungsstudie und die S/CO-Daten für C5, C50 und C95 aus der Verifizierungsstudie (vorhergesagt 0,73 bei 5 %, 1,01 bei 50 % und 1,38 bei 95 %) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 8. Schätzungen von C5, C50 und C95 S/CO

% Positive Reaktion	Test	Etablierung S/CO	Verifizierung S/CO
C05	Synovasure Alpha Defensin ELISA	0,69	0,73
C50	Synovasure Alpha Defensin ELISA	1,01	1,01
C95	Synovasure Alpha Defensin ELISA	1,48	1,38

Für alle positiven und negativen Testergebnisse wurden Punktschätzungen mit einem 95-%-Konfidenzintervall berechnet. Es wurde festgestellt, dass der geschätzte Anteil negativer Tests für C5 bei 95 % für die 0,71-S/CO-Probe mit einem 95-%-KI-Intervall von 86,06–98,96 % lag. Der geschätzte Anteil positiver Tests für C95 betrug 98,33 % für die 1,42-S/CO-Probe mit einem 95 %-KI-Intervall von 91,06–99,96 %. Der Cutoff wurde mit einem positiven Ergebnis von 38,33 % ebenfalls verifiziert, was den Akzeptanzkriterien von 35–65 % positiv entsprach. Die niedrig negativen und moderat positiven Werte erfüllten ebenfalls die Akzeptanzkriterien.

Störsubstanzen

Die Wirkung von Hämoglobin, Triglycerid und Bilirubin (konjugiert und unkonjugiert) wurde in einer Alpha-Defensin-1–3-negativen und einer Alpha-Defensin-1–3-positiven Probe gemäß den im CLSI-Protokoll EP7-A2⁵ beschriebenen Verfahren getestet. Für jede Substanz ist in der folgenden Tabelle 8 die höchste Konzentration angegeben, die als nicht relevant für die klinische Interpretation der Ergebnisse angesehen wurde:

Tabelle 9. Störsubstanzen

Typ	Störsubstanz	Konzentration, bei der das Produkt keine Störungen aufweist
Exogen	UHMWPE (10 mg/ml)	10 mg/ml
	Knochenzement (10 mg/ml)	10 mg/ml
	Kobalt (10 mg/l)	10 mg/ml
	Chrom (10 mg/l)	10 mg/ml
	Titan (10 mg/l)	10 mg/ml
Endogen	Rheumatoider Faktor 300 IU/ml	300 IU/ml
	Hämoglobin 200 mg/dl	200 mg/dl
	Bilirubin (unkonjugiert) 20 mg/dl	20 mg/dl
	Bilirubin (konjugiert) 29 mg/dl	29 mg/dl
	Triglycerid 418 mg/dl	418 mg/dl

Hinweis: Sämtliche Beanstandungen hinsichtlich des Produkts müssen mithilfe des Experience Report (Berichts zu Produkterfahrungen) (Formular Nr. GBLF04001) über folgende E-Mail-Adresse an Zimmer Biomet gemeldet werden: product.experience@zimmerbiomet.com. Schwere unerwünschte Ereignisse sind zudem der zuständigen Behörde des jeweiligen EU-Mitgliedsstaates zu melden, in dem das Ereignis aufgetreten ist.

Medizinische Fachkräfte, Benutzer und Patienten sollten jeglichen Verdacht auf schwerwiegende Vorfälle in Bezug auf das Produkt melden, indem sie sich unter www.zimmerbiomet.com an den Hersteller oder den Vertrieb vor Ort und die zuständige Behörde, das Gesundheitsamt oder die eingerichtete Agentur des Mitgliedsstaates wenden, in dem es zu diesem schwerwiegenden Vorfall gekommen ist. Patienten in Australien: Bitte besuchen Sie die Website der Therapeutic Goods Administration (TGA): <https://www.tga.gov.au>.

Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an Zimmer Biomet unter der folgenden Nummer. In den USA wählen Sie bitte 1-800-348-2759. Für Anrufe außerhalb der USA wählen Sie bitte die lokale internationale Vorwahl +1-574-267-6131.

Synovasure ist eine eingetragene Marke von Zimmer Biomet Holdings Inc., dem Nachfolger von Zimmer Holdings Inc.

Änderungsübersicht

Version	Gültigkeitsdatum	Änderungen gegenüber der Vorversion
4	September 2022	• Aktualisierte Erklärung zum Verwendungszweck, um die Anforderungen der EU-IVDR 2017/746 zu erfüllen. • Aktualisierte Symbole, Symbolschlüssel gemäß den Anforderungen der EU-IVDR 2017/746. Aktualisiertes CE-Zeichen mit CE-Nummer. • Aktualisierter Abschnitt „Leistungsmerkmale“ mit Daten aus der klinischen Diagnosestudie, C5-C95-Studie, Präzisions- und Interferenzstudie. • Ein Hinweis für Benutzer mit den Kontaktinformationen von Zimmer Biomet wurde hinzugefügt, um Beschwerden/Probleme zu melden. • Die Änderungsübersicht wurde hinzugefügt, um die Anforderungen der EU-IVDR 2017/746 zu erfüllen.
5	August 2024	• Aktualisierter Abschnitt zu Sicherheitsmaßnahmen. • Aktualisierte Symbole, Symbolschlüssel gemäß den Anforderungen der EU IVDR 2017/746 und der EG-Verordnung 1272/2008.

SYMBOLSCHLÜSSEL



Gebrauchsanweisung
<http://labeling.zimmerbiomet.com>



Artikelnummer



Lagertemperatur



Verfallsdatum



Nicht steril



Vor Nässe schützen



Warnung: Hautreizend



Chargennummer



Hersteller



Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union



IVD



Vorsichtsmaßnahmen/Warnungen



Menge



Eindeutige Produktkennung



CD Diagnostics, Inc.
650 Naamans Road
Suite 100
Claymont, DE 19703

