

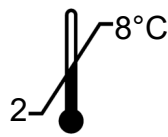
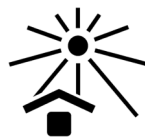
**ELISA**  
zur Bestimmung von  
Autoantikörpern (IgM) gegen  
Cardiolipin

**Gebrauchsinformation**

**REF** 0511FE00.FWD  12 x 8 Bestimmungen

**IVD**

**CE**



**STEFFENS** BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Baumgartenstr. 5  
D-79285 Ebringen (FRG)  
Tel./Fax: +49 7664 60025-4 / -5  
Email: [info@steffens-biotec.com](mailto:info@steffens-biotec.com)

## **Inhalt**

1. Einführung und Hintergrund
2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen
3. Testprinzip
4. Inhalt des Testkits
5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien
6. Aufbewahrung des Testkits
7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben
8. Durchführung des Tests
  - 8.1. Manuelle Durchführung
  - 8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System
9. Auswertung und Qualitätskontrolle
10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode
11. Testcharakteristika
  - 11.1. Standardisierung
  - 11.2. Analytische Spezifität
  - 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)
  - 11.4. Homogenität der Festphase
  - 11.5. Linearität
  - 11.6. Präzision
  - 11.7. Häufigkeitsverteilung von CL/β2-GP1 IgM
  - 11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System
12. Garantie und Haftung
13. Symbole
14. Literatur
15. Kurzanleitung

Das hier beschriebene Produkt entspricht den Anforderungen der IVD-Direktive 98/79/EG.

Dokument Id.-No. / Version: 0511FE30.FWD.doc / 2018-07-06

## 1. Einführung und Hintergrund

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) ist eine Autoimmun-Erkrankung, die sich klinisch auf unterschiedliche Weise manifestieren kann: in arteriellen und venösen Thrombosen, Thrombozytopenie, Herzinfarkt, habituellen Aborten oder neurologischen Komplikationen (1, 2, 3).

Cardiolipin (CL) ist das verbreitetste negativ geladene, saure Phospholipid. Die mit APS assoziierten Autoantikörper sind nicht nur gegen CL und ähnliche Phospholipide gerichtet, sondern auch gegen deren Proteinkomplexe.  $\beta$ 2-Glycoprotein 1 ( $\beta$ 2-GP1; = Apolipoprotein H) ist ein derartiges natürliches und essentielles Co-Antigen für CL-Autoantikörper (4, 5). Das Auftreten von CL/ $\beta$ 2-GP1 Autoantikörpern geht einher mit einer Tendenz zu Thrombosen (3). Abgesehen von ihrer diagnostischen Bedeutung sind diese Antikörper offenbar auch direkt an der Pathogenese des APS beteiligt (6, 7).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, Antikörper (IgM) gegen CL/ $\beta$ 2-GP1 in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) quantitativ oder qualitativ zu messen. Das immobilisierte Antigen ist ein Kombinations-Präparat aus Rinderherz-CL und hochgereinigtem natürlichem  $\beta$ 2-GP1. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30-30-30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase, gebrauchsfertige Reagenzien). 6 Standards erlauben quantitative Messungen; eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes.

## 2. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren. Er darf nur von geschultem Personal eingesetzt werden.

Die Reagenzien nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Als antimikrobielles Reagenz enthalten Probenpuffer, Standards und Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Standards und Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.

Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

### **3. Testprinzip**

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit CL und  $\beta$ 2-GP1. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: CL/ $\beta$ 2-GP1-spezifische Antikörper aus der Probe binden an das immobilisierte Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgM gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung spiegelt die Menge an CL/ $\beta$ 2-GP1 IgM in der Probe wider.

#### 4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit CL/β2-GP1 und hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 Streifen, die sich jeweils in 8 Einzelkavitäten teilen lassen.

<b>MWP</b>	<b>12x8</b>
------------	-------------

- b. Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt. Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

<b>BUF</b>	<b>SPL</b>
------------	------------

- c. Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt. Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.

<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>10x</b>
------------	-------------	------------

- d. 6 Standards à 2,0 mL, 0 - 3,0 - 8,0 - 18 - 45 und 100 MPL-U CL/β2-GP1 IgM / mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

<b>CAL</b>	<b>1-6</b>
------------	------------

- e. Negative und positive Kontrolle, je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt. Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>	<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------	----------------	----------

- f. Anti-human IgM HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

<b>CONJ</b>	<b>IgM</b>
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

<b>SOLN</b>	<b>STOP</b>
-------------	-------------

- i. Gebrauchsinformation
- j. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat

## 5. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 und 1000  $\mu\text{L}$  (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwascher (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

## 6. Aufbewahrung des Testkits

Der Testkit muss bei 2 - 8°C gelagert werden. Er ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

## 7. Reagenzien- und Probenvorbereitung / Anforderungen an die Proben

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden. Wird der Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt! Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen.

Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.

- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 - 8°C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben: Patientenserum als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben. Neben Serum ist auch EDTA-, Citrat- oder Heparin-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet.

Anforderungen an die Proben: Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

Die Proben werden mit dem Probenpuffer 1:100 in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Standards, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, so müssen sie eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Auftaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

## 8. Durchführung des Tests

### 8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 ± 3°C) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- a. Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je 350 µL Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- b. Je 100 µL der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben zügig in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen werden empfohlen.

Die Kavitätenplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) inkubieren.

- c. Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- d. Je 100  $\mu\text{L}$  Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, grün) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- e. Waschschritt c wiederholen.
- f. Je 100  $\mu\text{L}$  Substrat (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- g. Je 100  $\mu\text{L}$  Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- h. Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei  $2 - 8^\circ\text{C}$  lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

## 8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

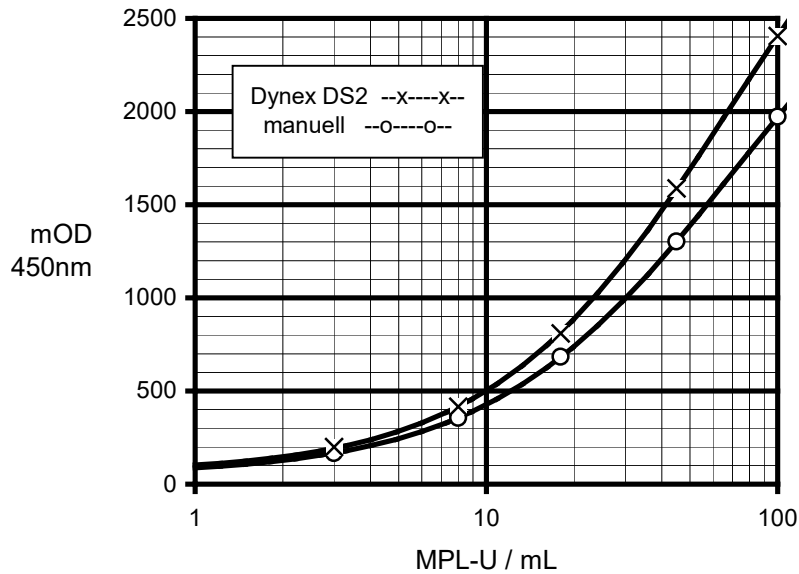
Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts.

Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

## 9. Auswertung und Qualitätskontrolle

Quantitative Auswertung: Die Messdaten werden anhand einer Standardkurve quantitativ ausgewertet. Die unten dargestellte Kurve kann jedoch nicht die Messung der Standards bei der Testdurchführung ersetzen, zusammen mit den Kontrollen und den aktuellen Proben. Sie dient lediglich als Modell. Die Kurve wurde von einem üblichen ELISA Auswertungsprogramm mit einer 4-Parameter-Funktion errechnet; die Spline-Approximation ist ebenso geeignet.





0511FE00.FED/StdKurveV1310J

Steht keine Rechner-gestützte Auswertung zur Verfügung, so zeichnet man die Standardkurve per Hand und liest an ihr die Antikörper-Konzentration in den Proben ab (MPL-U CL/β2-GP1 IgM / mL Probe).

Qualitative Auswertung: Der Test kann auch auf qualitative Art ausgewertet werden. Dazu muss nur die positive Kontrolle gemessen werden; allerdings empfiehlt es sich, auch die negative Kontrolle zu messen (s.u.: Qualitätskontrolle).

Bei der qualitativen Testauswertung wird die Absorption der Proben mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off) verglichen. Diese errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an CL/β2-GP1 IgM ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

Absorption <sub>cut-off</sub>	= 438 mOD
Absorption <sub>Probe</sub>	= 1480 mOD
Ratio	= 1480 mOD / 438 mOD = 3,4

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweiligen Sollwerte und akzeptablen Bereiche sind im Chargenspezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests nicht gültig.

## 10. Interpretation der Ergebnisse / Grenzen der Methode

Auf der Basis einer Serienmessung von Blutspender- und Positiv-Seren (s.u.) schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

Auswertung	quantitativ MPL-U / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 5,0	< 0,87
cut-off	6,0	1,00
grenzwertiger Bereich	5,0 - 7,2	0,87 - 1,16
positiver Bereich	> 7,2	> 1,16

Diese Spezifikationen sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten in jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Patient keinen erhöhten Titer an IgM-Antikörpern gegen CL/β2-GP1 aufweist. Sind jedoch charakteristische klinische Anzeichen des APS erkennbar, sollten IgG/IgA-Antikörper gegen CL und/oder β2-GP1 bestimmt werden.

Ein positives Ergebnis sollte als Hinweis auf das APS interpretiert werden, wie eingangs ausgeführt.

Proben mit grenzwertigen Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

## 11. Testcharakteristika

### 11.1. Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das spezifisch gegen CL/β2-GP1 gerichtete IgM-Antikörper enthält. Es wird seinerseits kalibriert an einem Satz kommerziell verfügbarer, graduell-positiver Seren ("Harris-Seren"; Louisville APL Diagnostics Inc., Louisville, KY, USA). Der Reaktivitätsgrad einer Probe wird in MPL-Einheiten (MPL-U CL/β2-GP1 IgM / mL) angegeben. 1 MPL-U / mL entspricht der Antigen-Bindungskapazität einer Lösung mit 1 µg IgM-Antikörpern / mL, welcher aus dem Standardserum Affinitäts-gereinigt wurde.

### 11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgM-Antikörper nach, die gegen CL/β2-GP1 gerichtet sind.

### 11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

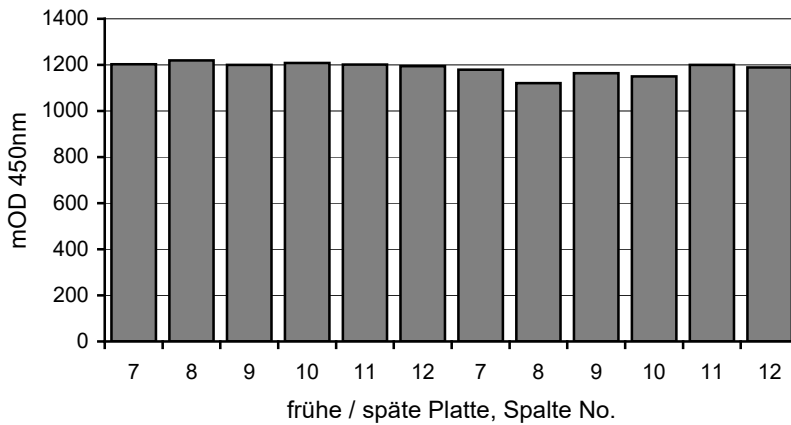
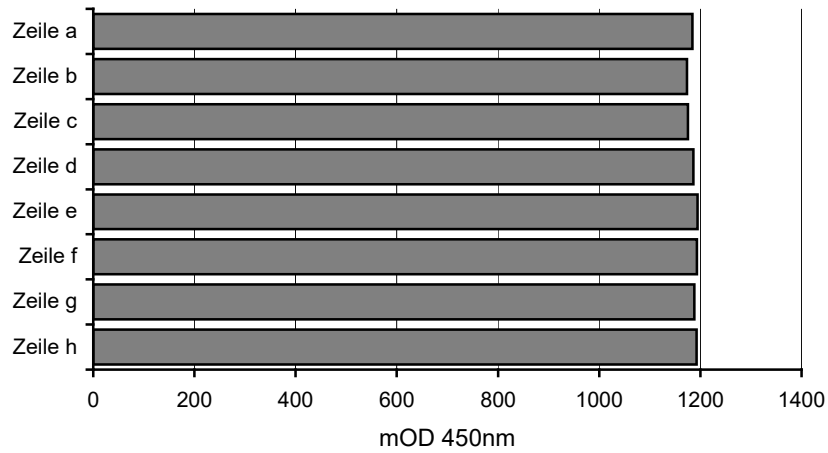
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu < 0,5 MPL-U / mL Probe bestimmt (n = 24).

Empfohlener Messbereich: 2 - 100 MPL-U / mL Probe.

### 11.4. Festphasen-Homogenität

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer IgG-positiven, aber nicht sättigenden Probe auf 3 ausgewählten Platten. Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK) über die Platten < 8%. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 2103F).

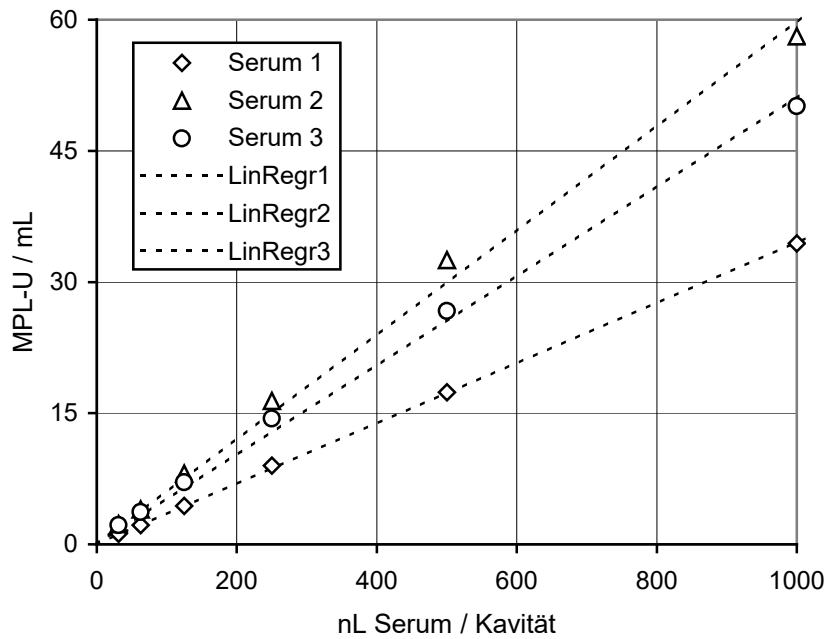
Platte	früh (n/10)						spät (9n/10)						MW	VK %
Spalte	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12		
Zeile a	1220	1225	1206	1208	1199	1186	1191	1128	1133	1147	1177	1195	1185	2,7
Zeile b	1184	1215	1187	1214	1177	1204	1172	1103	1146	1149	1165	1169	1174	2,7
Zeile c	1203	1209	1184	1194	1181	1177	1166	1134	1138	1145	1200	1175	1176	2,2
Zeile d	1234	1217	1172	1198	1204	1201	1211	1133	1174	1117	1185	1191	1186	2,8
Zeile e	1201	1235	1219	1201	1215	1207	1183	1152	1191	1134	1208	1186	1194	2,4
Zeile f	1188	1219	1208	1202	1203	1200	1169	1135	1184	1191	1227	1189	1193	2,0
Zeile g	1190	1213	1215	1227	1202	1175	1165	1107	1183	1164	1219	1197	1188	2,8
Zeile h	1197	1227	1212	1228	1231	1209	1174	1078	1164	1157	1223	1208	1192	3,7
MW	1202	1220	1200	1209	1202	1195	1179	1121	1164	1151	1201	1189	<b>1186</b>	
VK %	1,4	0,7	1,4	1,1	1,4	1,1	1,3	2,1	1,9	1,9	1,9	1,0		<b>2,7</b>



0511FE00.FED/FphHomV1310J

### 11.5. Linearität

Um die Dosis / Wirkungs-Beziehung des Tests zu bestimmen, wurden positive Seren in serieller Zweifachverdünnung gemessen. Akzeptanz-Kriterium: Die lineare Regression vierer sukzessiver Verdünnungen muss einen Korrelationsfaktor  $> 0,98$  ergeben. Ein typisches Ergebnis ist hier abgebildet.



0511FE00.FED/LinearV1310J

### 11.6. Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen.

#### a. Intra- und Inter-Assay Variabilität (n = 24 bzw. 72)

Probe	Mittelwert (MW) MPL-U/mL	Variabilität (VK, %) intra-Assay	inter-Assay
1	8,8	2,6	3,1
2	18	5,6	6,1
3	47	3,0	3,6

#### b. Operator-zu-Operator Variabilität (n = 12)

Probe	MW MPL-U/mL	Variabilität (VK, %)
1	10	2,9
2	19	5,9
3	51	5,9

c. Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n = 6)

Probe	MW MPL-U/mL	Variabilität (VK, %)
1	8,3	6,8
2	19	6,1
3	45	7,8

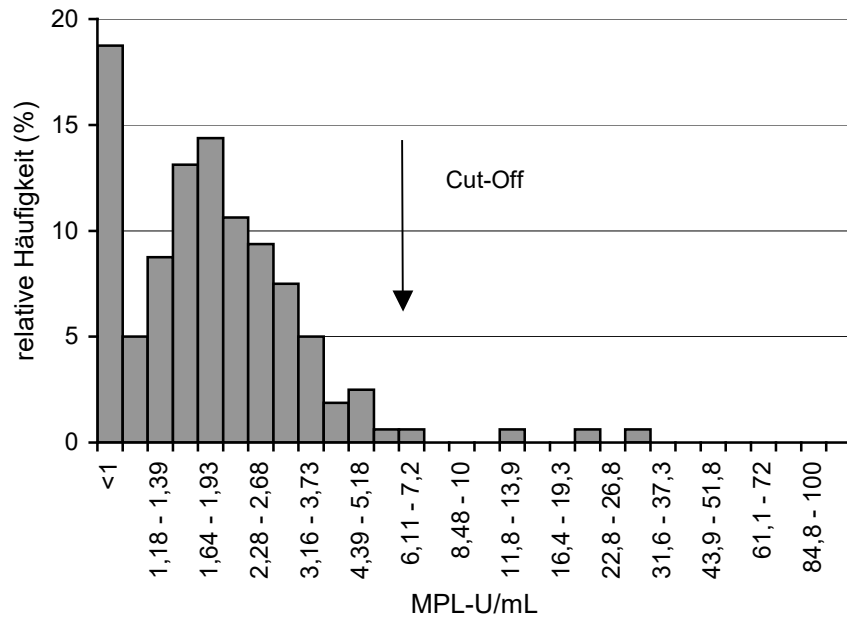
11.7. Häufigkeitsverteilung von CL/β2-GP1 IgM

Diese wurde bestimmt in einem Blutspender-Serenkollektiv, gleichmäßig nach Alter und Geschlecht verteilt, und einem Serenkollektiv, das in drei verschiedenen, CE-konformen Referenz-ELISAs positiv gefunden worden war. Folgende Verteilung des Analyten wurde beobachtet:

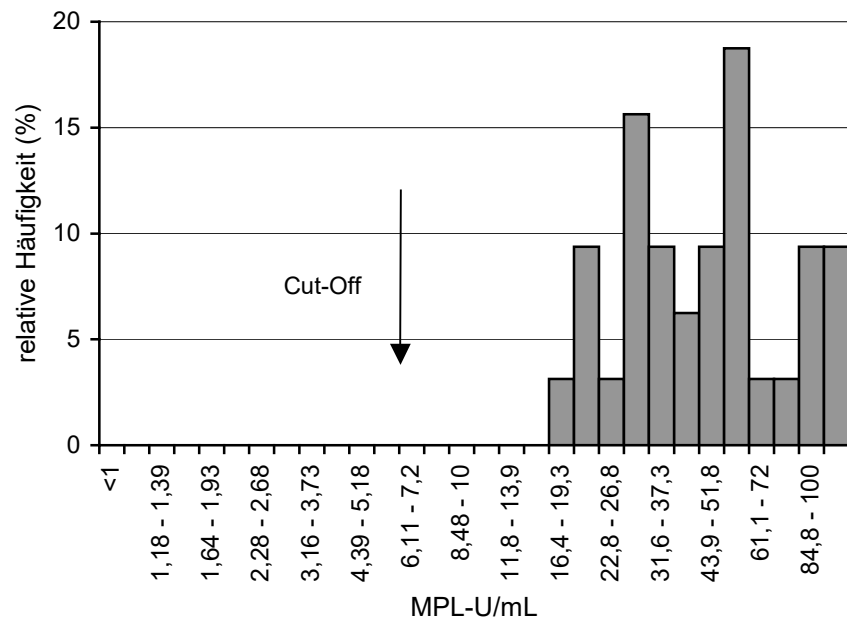
Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	32
MW:	2,3 MPL-U/mL	MW:	55 MPL-U/mL
MW + s:	5,2 MPL-U/mL	MW - s:	20 MPL-U/mL
MW + 2s:	8,2 MPL-U/mL	MW - 2s:	< 0 MPL-U/mL
Median:	1,7 MPL-U/mL	Median:	46 MPL-U/mL
95. Perzentile:	4,5 MPL-U/mL	5. Perzentile:	21 MPL-U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 6,0 MPL-U/mL bestimmt (8). Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von 98 bzw. annähernd 100 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

### Blutspender-Seren



### Positiv-Seren



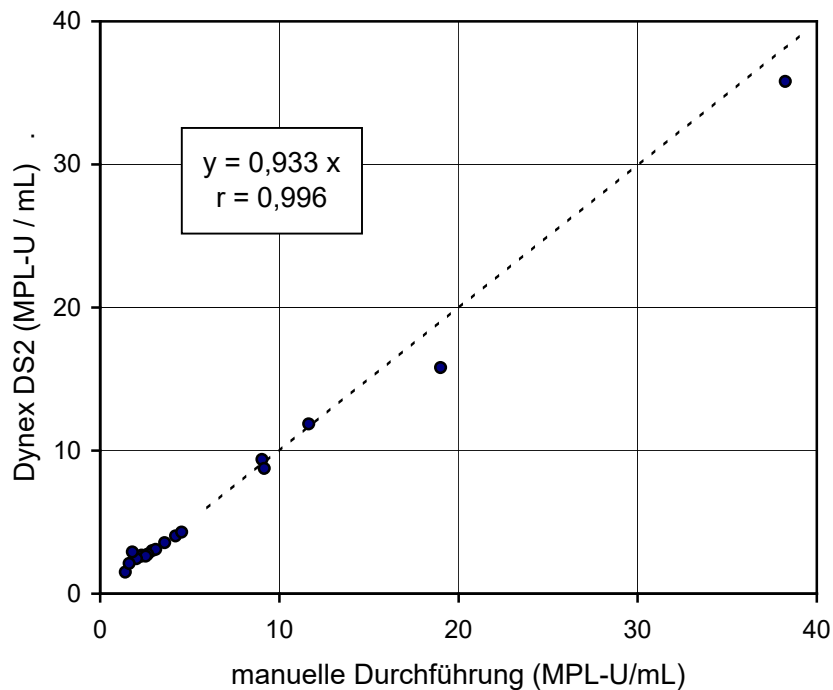
0511FE00.FED/HaufgPlotV1310J

11.8. Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System  
 Variabilität: Mit Testkits aus einer einzigen Produktions-Charge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System:

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n = 16)	mittl. VK = 1,6 %	mittl. VK = 3,0 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 1,9 %	mittl. VK = 4,2 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



0511FE00.FED/KorrDynexDS2-V1310J



## 12. Garantie und Haftung

Steffens biotechnische Analysen GmbH (SBA) garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert SBA jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann SBA keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

## 13. Symbole



Artikel-Bezeichnung



Chargen-Bezeichnung



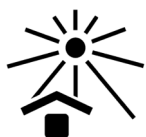
Enthält x Bestimmungen



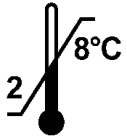
Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

## 14. Literatur

1. Gromnica-Ihle, E., und Schössler, W.: Antiphospholipid Syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 123 (2000), 67 - 76
2. Harris, E. N., et al.: Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* Nov 26 (1983), 1211 - 1214
3. Petri, M.: Epidemiology of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *J Autoimm* 15 (2000), 145 - 151
4. Galli, M., et al.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma cofactor. *Lancet* 335 (1990), 1544 - 1547
5. Matsuura, E., et al.: Anticardiolipin antibodies recognise  $\beta$ 2-Glycoprotein 1 structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 179 (1994), 457 - 462
6. Shoenfeld, Y., et al.: Induction and treatment of the antiphospholipid syndrome - lessons from animal models. *Eur J Clin Invest* 31 (2001), 736 - 740
7. Pierangeli, S. S., et al.: Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1051 (2005), 413 - 420
8. Sommer, R., und Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

## 15. Kurzanleitung

- a. Die Proben 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350  $\mu$ L Waschpuffer waschen. Dann je 100  $\mu$ L der Standards (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, abgestuft blau), der Kontrollen (je 2,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot) und der verdünnten Proben in die Kavitäten pipettieren. Doppelbestimmungen sind zu empfehlen. 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350  $\mu$ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100  $\mu$ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, grün) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100  $\mu$ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100  $\mu$ L Stoplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Quantitative Auswertung: Die Standardkurve ermitteln und anhand dieser Kurve die Absorption der Proben in ihre jeweilige Antikörper-Konzentration (MPL-U/mL) umformen.
- j. Qualitative Auswertung: Die grenzwertige Absorption ermitteln, indem die Absorption der positiven Kontrolle mit dem Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann die Ratio-Werte der Proben berechnen, indem ihre Absorption durch die grenzwertige Absorption dividiert wird.