

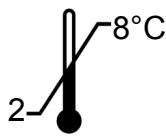
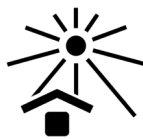
**ELISA**  
zur Bestimmung von  
Autoantikörpern (IgG) gegen  
**β2-Glycoprotein 1**

**Gebrauchsinformation**

**REF** 0711FE00.FWD  12 x 8 Bestimmungen

**IVD**

**CE**



**STEFFENS** BIOTECHNISCHE ANALYSEN GmbH

Gewerbestr. 7  
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  $\beta$ 2-GP1 IgG
  - 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: 0711FE30.FWD.doc / 2019-08-07

## 1. Einführung und Hintergrund

Das Anti-Phospholipid-Syndrom (APS) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die klinische Zustände wie venöse und arterielle Thrombose, Thrombozytopenie, Herzinfarkt, wiederkehrende Spontanabtreibung und neurologische Komplikationen umfassen kann (1, 2, 3, 4). Zusätzlich zu diesen klinischen Manifestationen definiert das anhaltende Vorhandensein einer einzigartigen Sammlung von Autoantikörpern das Syndrom. Diese Autoantikörper richten sich gegen spezifische Phospholipide und Phospholipid-bindende Proteine.

Cardiolipin (CL) ist das verbreitetste negativ geladene, saure Phospholipid. beta2-Glycoprotein 1 ( $\beta$ 2-GP1; = Apolipoprotein H) wurde als natürliches und essentielles Co-Antigen für CL-Autoantikörper identifiziert (5, 6). Neben ihrer diagnostischen Bedeutung verursachen diese Antikörper einen hyperkoagulablen Zustand, der mit einer Tendenz zu Thrombosen (4, 7, 8) verbunden ist und vermutlich direkt an der Pathogenese von APS (9, 10) beteiligt ist. Der eigentliche Mechanismus dieses Effekts bleibt jedoch unklar.

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, Antikörper (IgG) gegen  $\beta$ 2-GP1 in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) quantitativ oder qualitativ zu messen. Das immobilisierte Antigen ist ein hochgereinigtes, humanes  $\beta$ 2-GP1-Präparat. 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  $\beta$ 2-GP1. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion:  $\beta$ 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-IgG 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  $\beta$ 2-GP1 IgG in der Probe wider.

#### 4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit  $\beta$ 2-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 U  $\beta$ 2-GP1 IgG / 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 IgG HRP-Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

<b>CONJ</b>	<b>IgG</b>
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und  $H_2O_2$ , abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

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

- h. Stopplösung (0,2 M  $H_2SO_4$ ), 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 mit üblicher Labortechnik präparieren. Trübe Proben müssen zunächst geklärt (zentrifugiert) werden. Die klaren oder geklärten 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. Aufgetaute 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 µL Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, rot) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.

e. Waschschrift c wiederholen.

f. Je 100 µL 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 µL 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

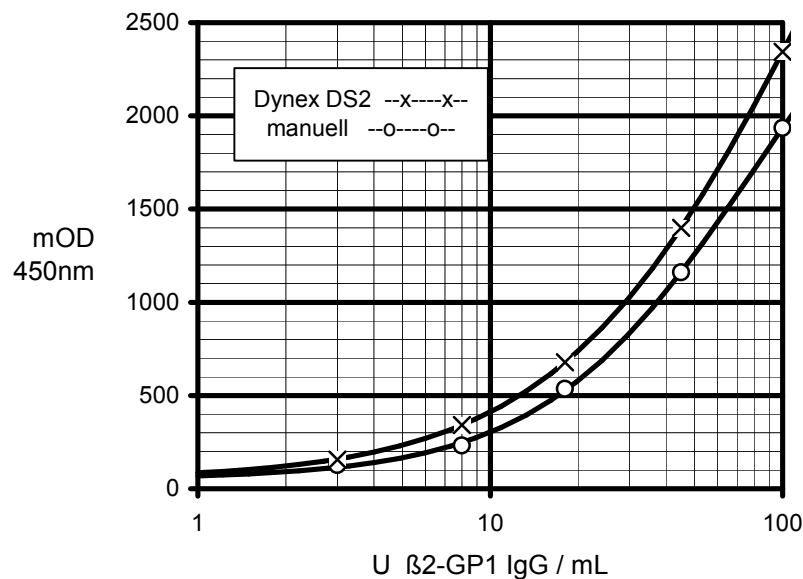
Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender 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.



0711FE00.FED\StdKurveV0712J

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 (U β2-GP1 IgG / 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:

$$\text{Absorptioncut-off} = \text{Absorptionpositive Kontrolle} \times \text{Faktor}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Absorptionpositive Kontrolle} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorptioncut-off} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe an  $\beta$ 2-GP1 IgG ist, kann man ihre Ratio berechnen, nach der Formel:

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

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

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 U $\beta$ 2-GP1 IgG / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 10,0	< 0,84
cut-off	12,0	1,00
grenzwertiger Bereich	10,0 - 14,4	0,84 - 1,19
positiver Bereich	> 14,4	> 1,19

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 IgG-Antikörpern gegen  $\beta$ 2-GP1 aufweist. Sind jedoch charakteristische klinische Anzeichen des APS erkennbar, sollten IgA/IgM-Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1 und/oder Antikörper gegen CL bestimmt werden.

Ein positives Ergebnis sollte als Hinweis auf das APS interpretiert werden, wie eingangs ausgeführt. Es muss jedoch mindestens zweimal positiv sein, getrennt durch 12 Wochen, um als Diagnose für APS (1) angesehen zu werden.

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  $\beta$ 2-GP1 gerichtete IgG-Antikörper enthält. Es wird seinerseits kalibriert am "DeBari"-Standardserum (9). Der Reaktivitätsgrad einer Probe wird in relativen ("DeBari")-Einheiten (U  $\beta$ 2-GP1 IgG / mL) angegeben.

### **11.2. Analytische Spezifität**

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen  $\beta$ 2-GP1 gerichtet sind.

### **11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)**

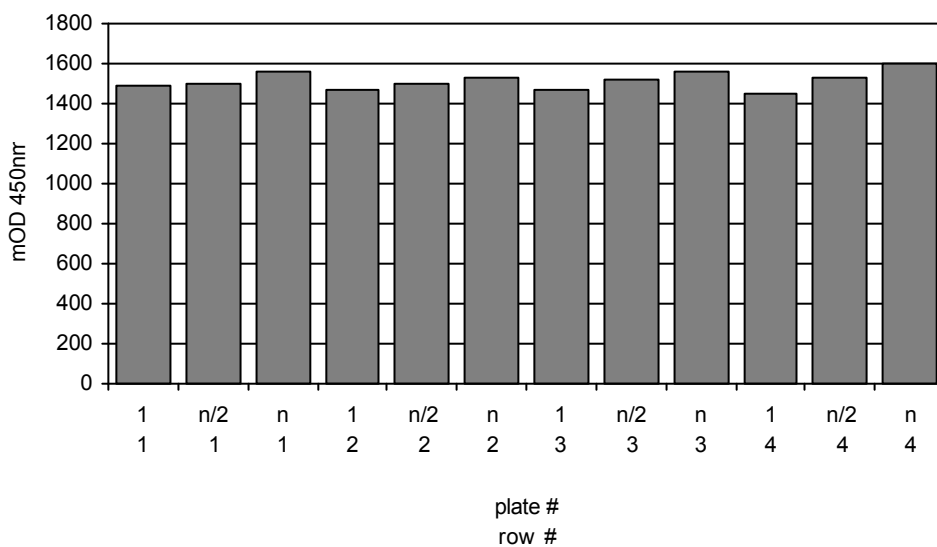
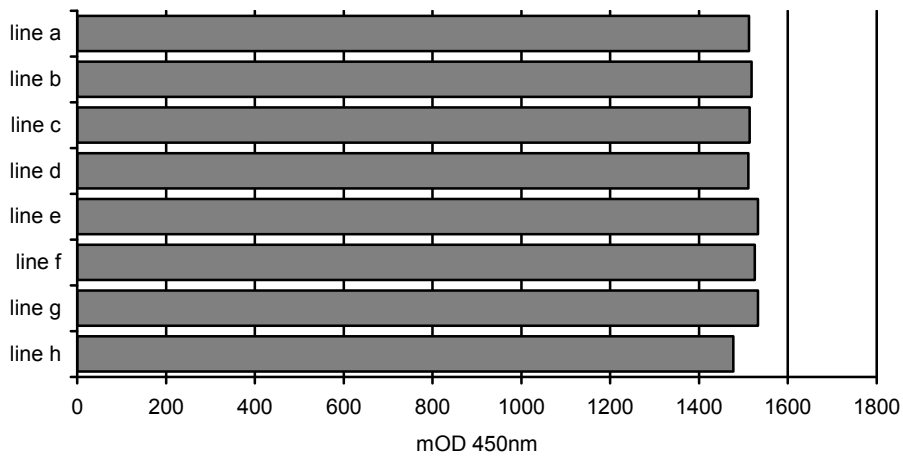
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu  $< 0,5$  U  $\beta$ 2-GP1 IgG / mL Serum bestimmt (n = 24).

Empfohlener Messbereich: 2 - 100 U  $\beta$ 2-GP1 IgG / mL Serum.

### **11.4. Festphasen-Homogenität**

Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch 288-fache Messung einer 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: 0104S).

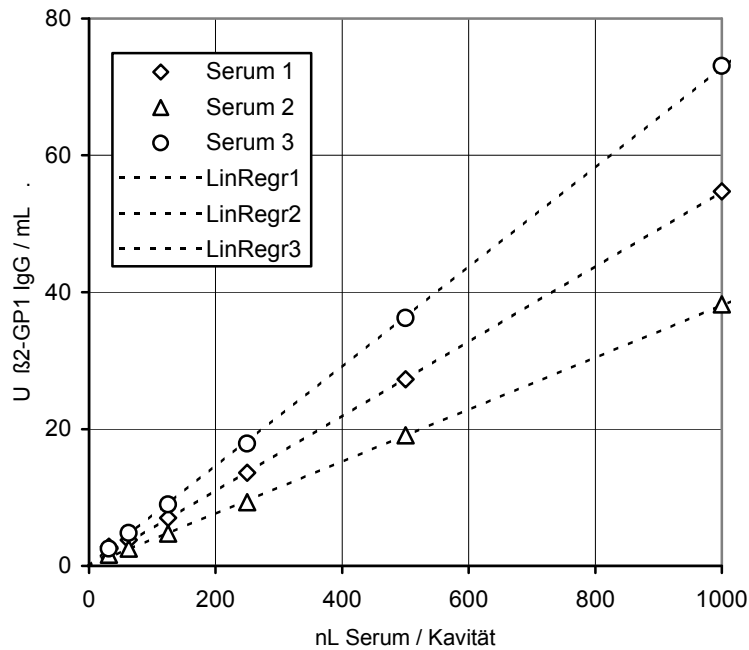
plate	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	mean	cv %
row	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	4		
line a	1496	1505	1585	1455	1516	1519	1546	1505	1526	1413	1510	1572	1512	3,1			
line b	1498	1516	1581	1465	1526	1550	1444	1516	1559	1425	1512	1628	1518	3,8			
line c	1520	1517	1544	1473	1520	1533	1440	1518	1545	1434	1510	1617	1514	3,2			
line d	1481	1479	1541	1449	1512	1549	1463	1534	1554	1445	1542	1580	1511	3,0			
line e	1508	1547	1586	1497	1507	1545	1476	1537	1604	1441	1542	1606	1533	3,3			
line f	1503	1493	1578	1480	1476	1547	1461	1528	1599	1473	1545	1622	1525	3,5			
line g	1489	1501	1577	1467	1513	1558	1495	1526	1577	1504	1574	1609	1533	2,9			
line h	1447	1440	1519	1451	1433	1467	1464	1487	1499	1450	1508	1560	1477	2,6			
mean	1493	1500	1564	1467	1500	1534	1474	1519	1558	1448	1530	1599	<b>1515</b>				
cv %	1,5	2,1	1,6	1,1	2,1	1,9	2,3	1,1	2,3	2,0	1,6	1,6					<b>3,3</b>



0611FE00.FED/0104S

### 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.



0711FE00.FED/LinearV0712J

### 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) U/mL	Variabilität (VK, %)	
		intra-Assay	inter-Assay
1	12	4,8	5,2
2	20	4,3	5,0
3	43	6,4	7,4

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

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	14	3,9
2	25	3,3
3	43	2,3

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

Probe	MW U/mL	Variabilität (VK, %)
1	15	10,0
2	25	8,5
3	52	10,4

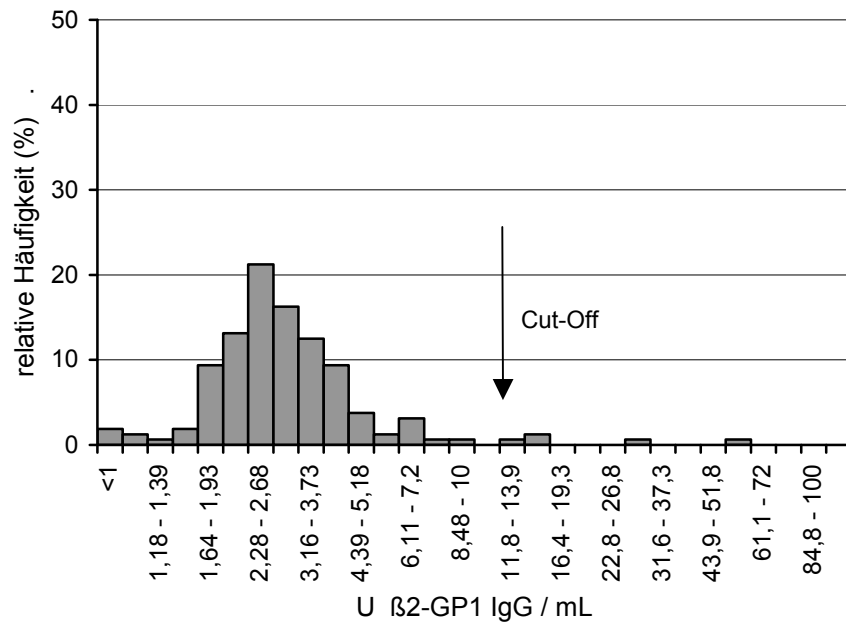
11.7. Häufigkeitsverteilung von  $\beta$ 2-GP1 IgG

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

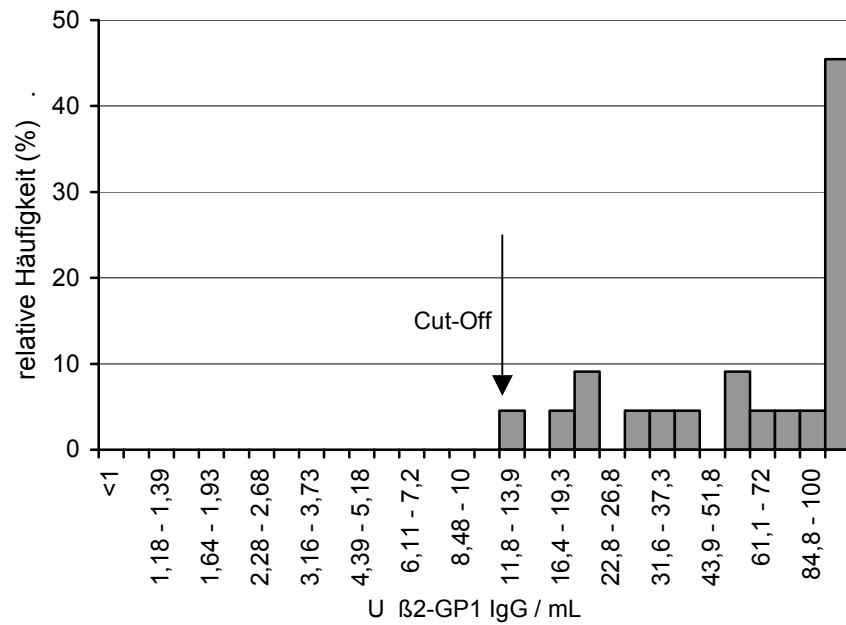
Blutspender-Seren		positive Seren	
n:	160	n:	22
MW:	3,7 U/mL	MW:	130 U/mL
MW + s:	8,6 U/mL	MW - s:	< 0 U/mL
MW + 2s:	13,5 U/mL	MW - 2s:	< 0 U/mL
Median:	2,7 U/mL	Median:	88 U/mL
95. Perzentile:	6,7 U/mL	5. Perzentile:	18 U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 12,0 U  $\beta$ 2-GP1 IgG / mL bestimmt (12). Aus den hier gezeigten Daten ergibt sich eine diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests von etwa 97 bzw. annähernd 100 %. Diese Werte gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen. Angesichts der geringen Anzahl positiver Seren ist bei der Interpretation der Testsensitivität besondere Vorsicht geboten.

### Blutspender-Seren



### Positiv-Seren



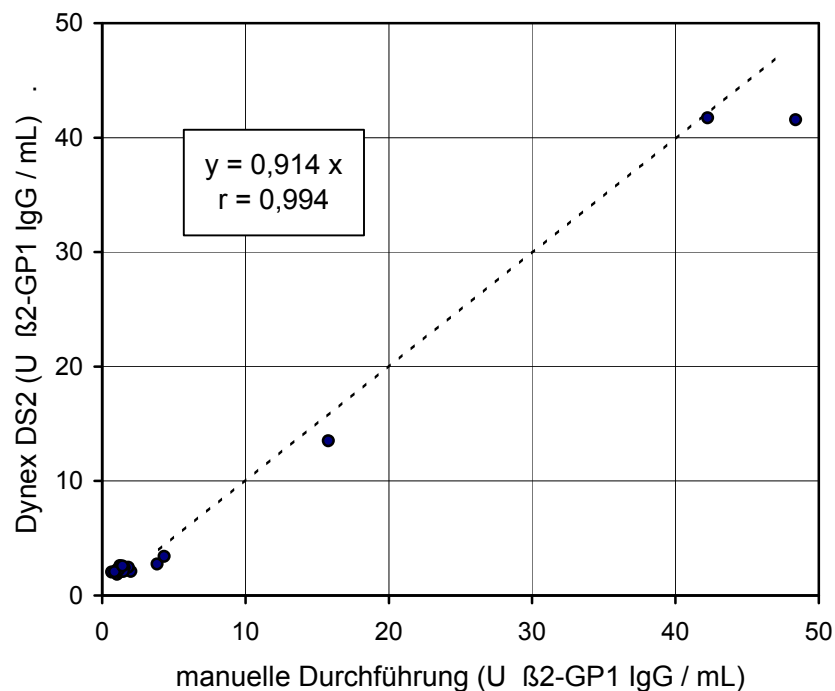
0711FE00.FED/HafigPlotV07121J

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 = 1,7 %	mittl. VK = 1,7 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 1,9 %	mittl. VK = 2,6 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



0711FE00.FED/KorrDynexDS2-V0712J



## 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



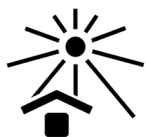
Enthält x Bestimmungen



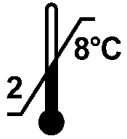
Für *in vitro* diagnostische Anwendung



Conformité Européenne



Lichtgeschützt aufbewahren



Bei 2 - 8°C lagern



Verfallsdatum



“Gebrauchsinformation” lesen



Warnung



Biologisches Risiko



Hergestellt von

## 14. Literatur

1. Ortel, T. L.: Antiphospholipid Syndrome Laboratory Testing and Diagnostic Strategies. *Am J Hematol.* 87 (2012), 75 - 81
2. Gromnica-Ihle, E., and Schössler, W.: Antiphospholipid Syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 123 (2000), 67 - 76
3. Harris, E. N., et al.: Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* Nov 26 (1983), 1211 - 1214
4. Petri, M.: Epidemiology of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *J Autoimm* 15 (2000), 145 - 151
5. Galli, M., et al.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma cofactor. *Lancet* 335 (1990), 1544 - 1547
6. 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
7. Lopez, L. R., et al.: Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 121 (2004), 142 - 149
8. Kelchtermans, H., et al.: IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14 (2016), 1530 - 1548
9. Shoenfeld, Y., et al.: Induction and treatment of the antiphospholipid syndrome - lessons from animal models. *Eur J Clin Invest* 31 (2001), 736 - 740
10. Pierangeli, S. S., et al.: Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1051 (2005), 413 - 420
11. Erickson, E. N., et al.: Reference calibrators for IgG antibodies to  $\beta$ 2-GP1: Preparation, properties, and availability to investigators. *Clin. Chem.* 42 (1996), 1116-1117
12. Sommer, R., and 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, rot) 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 (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.