

ELISA
zur Bestimmung von
Autoantikörpern (IgG) gegen
Cardiolipin

Gebrauchsinformation

REF

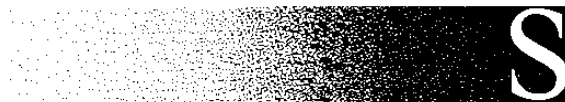
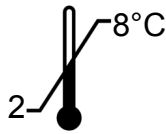
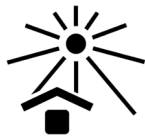
0411FE00.FWD



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

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 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: 0411FE30.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 (β 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 CL/ β 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 β 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 β 2-GP1. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: CL/ β 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 CL/ β 2-GP1 IgG 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.

MWP	12x8
------------	-------------

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

BUF	SPL
------------	------------

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

BUF	WASH	10x
------------	-------------	------------

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

CAL	1-6
------------	------------

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

CONTROL	-	CONTROL	+
----------------	----------	----------------	----------

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

CONJ	IgG
-------------	------------

- g. Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H₂O₂, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
-------------	------------

- h. Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig. Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

SOLN	STOP
-------------	-------------

- 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 μL (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: Patientenseren 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.

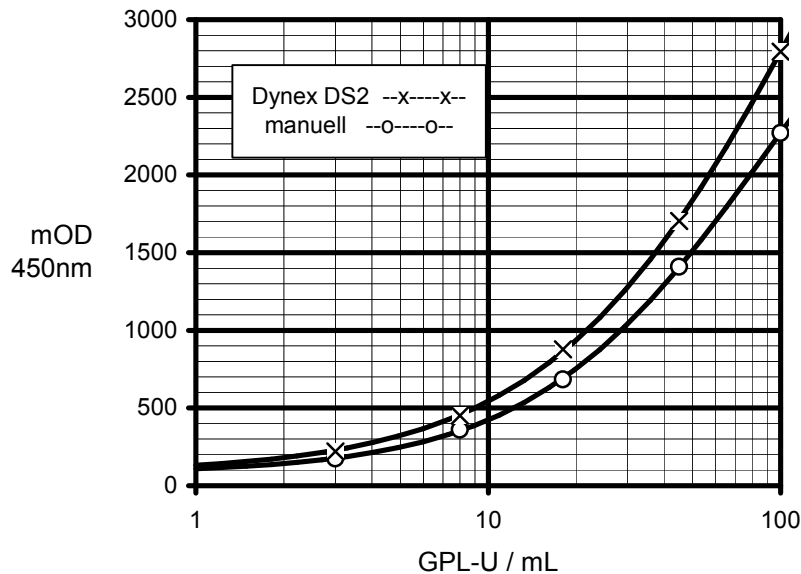
8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

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.



0411FE00.FED/StdKurveV1010J

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 (GPL-U CL/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:

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

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 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 GPL-U / mL Probe	qualitativ Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 10,0	< 0,86
cut-off	12,0	1,00
grenzwertiger Bereich	10,0 - 14,4	0,86 - 1,16
positiver Bereich	> 14,4	> 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 IgG-Antikörpern gegen CL/β2-GP1 aufweist. Sind jedoch charakteristische klinische Anzeichen des APS erkennbar, sollten IgM/IgA-Antikörper gegen CL und/oder β2-GP1 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 CL/β2-GP1 gerichtete IgG-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 GPL-Einheiten (GPL-U CL/β2-GP1 IgG / mL) angegeben. 1 GPL-U / mL entspricht der Antigen-Bindungskapazität einer Lösung mit 1 µg IgG-Antikörpern / mL, welcher aus dem Standardserum Affinitäts-gereinigt wurde.

11.2. Analytische Spezifität

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

11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

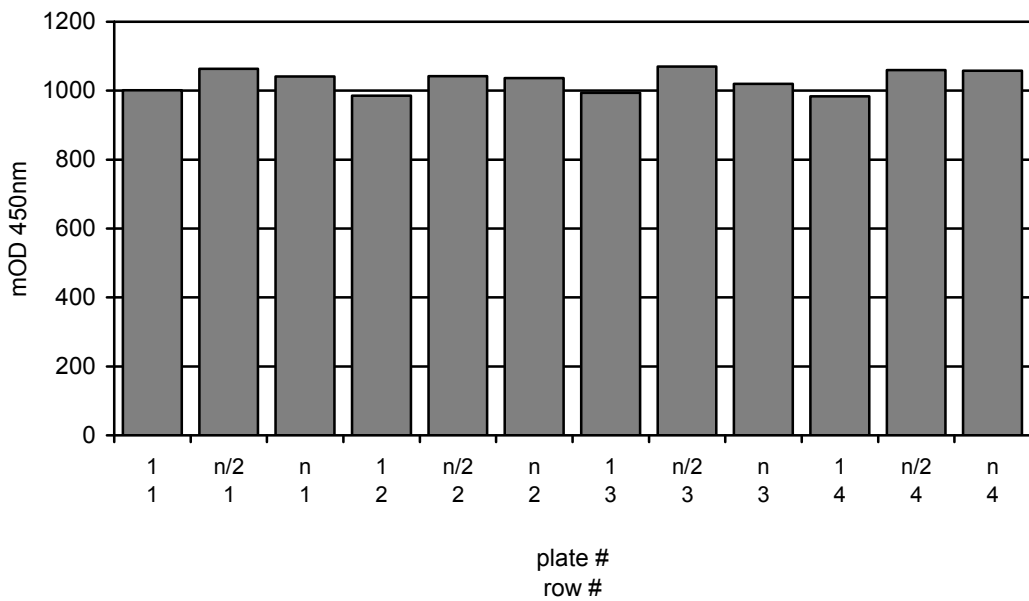
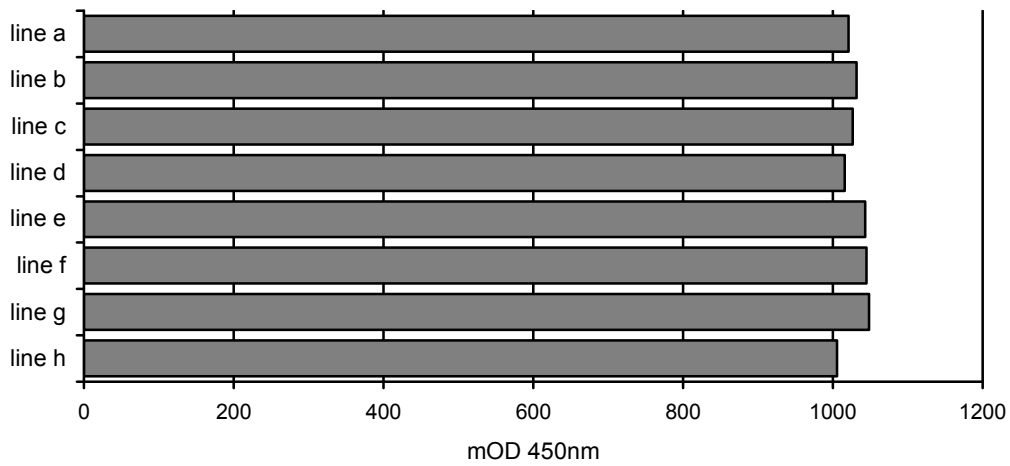
Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die dem OD-Mittelwert des Probenpuffers entspricht, zu dem die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu < 0,5 GPL-U / mL Probe bestimmt (n = 24).

Empfohlener Messbereich: 2 - 100 GPL-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 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: 2503S).

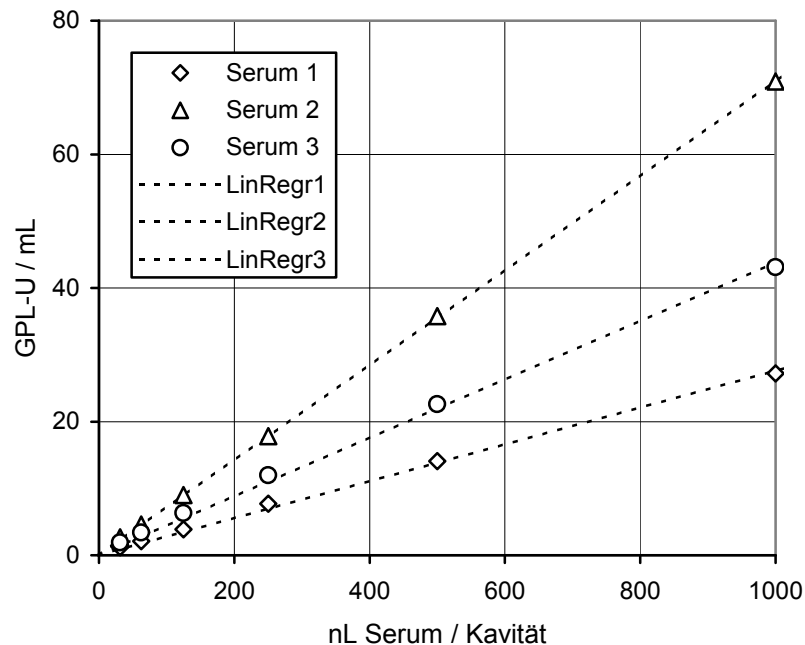
plate row	1 1	n/2 1	n 1	1 2	n/2 2	n 2	1 3	n/2 3	n 3	1 4	n/2 4	n 4	mean	cv %
line a	970	1048	1057	964	1041	1016	983	1077	1020	973	1072	1031	1021	3,9
line b	1018	1090	1025	978	1056	1004	976	1072	1036	988	1072	1063	1032	3,8
line c	1002	1053	1037	992	1041	1047	988	1062	1015	983	1043	1054	1026	2,8
line d	962	1054	1028	973	1023	1052	978	1052	1009	973	1041	1046	1016	3,5
line e	1026	1087	1049	997	1051	1050	1016	1074	1038	995	1069	1066	1043	2,8
line f	1020	1074	1045	1006	1049	1057	1007	1070	1035	1016	1080	1078	1045	2,7
line g	1020	1081	1057	998	1063	1050	1028	1075	1038	1008	1085	1075	1048	2,8
line h	995	1022	1032	976	1010	1015	972	1080	970	930	1014	1051	1006	4,0
mean	1002	1064	1041	986	1042	1036	994	1070	1020	983	1060	1058	1030	
cv %	2,4	2,2	1,2	1,5	1,7	2,0	2,1	0,9	2,3	2,7	2,3	1,5		3,5



0311FE00.FED/2503S

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.



0411FE00.FED/LinearV1010J

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) GPL-U/mL	Variabilität (VK, %)	
		intra-Assay	inter-Assay
1	10	3,2	4,6
2	19	3,2	3,4
3	65	2,8	2,9

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

Probe	MW GPL-U/mL	Variabilität (VK, %)
1	10	9,6
2	20	5,5
3	65	4,2

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

Probe	MW GPL-U/mL	Variabilität (VK, %)
1	11	4,6
2	21	2,5
3	73	3,1

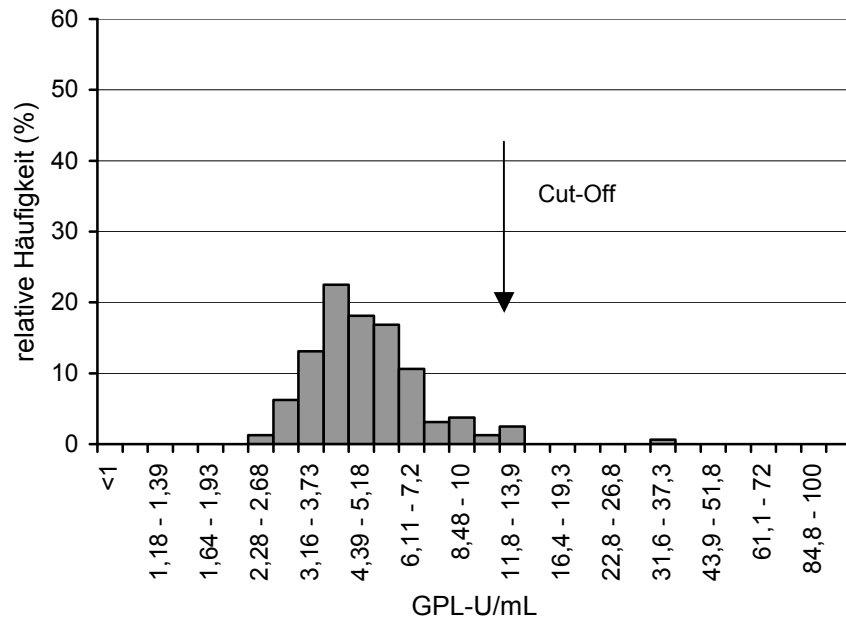
11.7. Häufigkeitsverteilung von CL/β2-GP1 IgG

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:

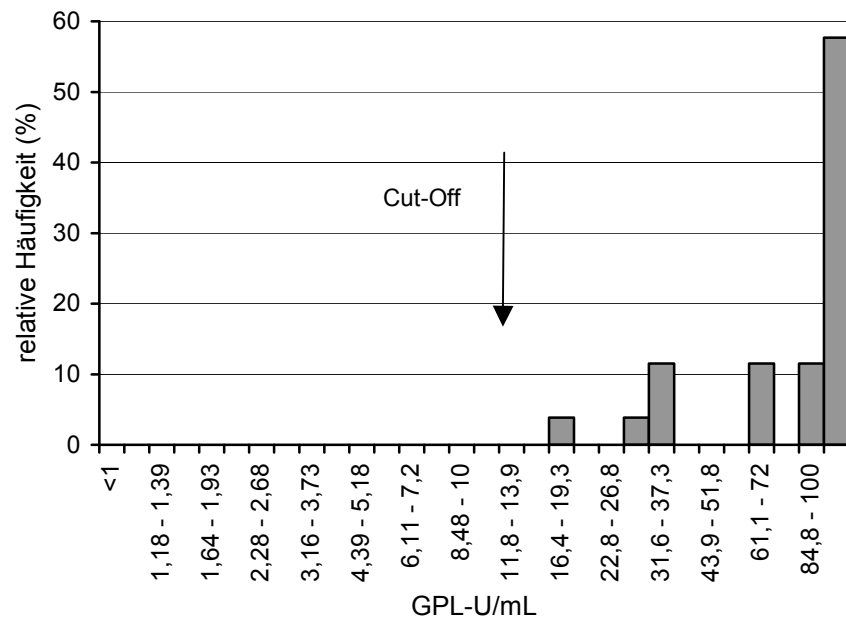
Blutspender-Seren			positive Seren		
n:	160		n:	26	
MW:	5,3	GPL-U/mL	MW:	126	GPL-U/mL
MW + s:	8,2	GPL-U/mL	MW - s:	59	GPL-U/mL
MW + 2s:	11	GPL-U/mL	MW - 2s:	< 0	GPL-U/mL
Median:	4,7	GPL-U/mL	Median:	123	GPL-U/mL
95. Perzentile:	9,5	GPL-U/mL	5. Perzentile:	30	GPL-U/mL

Mittels ROC-Analyse dieser Daten wurde der cut-off des ELISAs zu 12,0 GPL-U/mL bestimmt (11). 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. Angesichts der geringen Anzahl positiver Seren ist bei der Interpretation der Testsensitivität besondere Vorsicht geboten.

Blutspender-Seren



Positiv-Seren



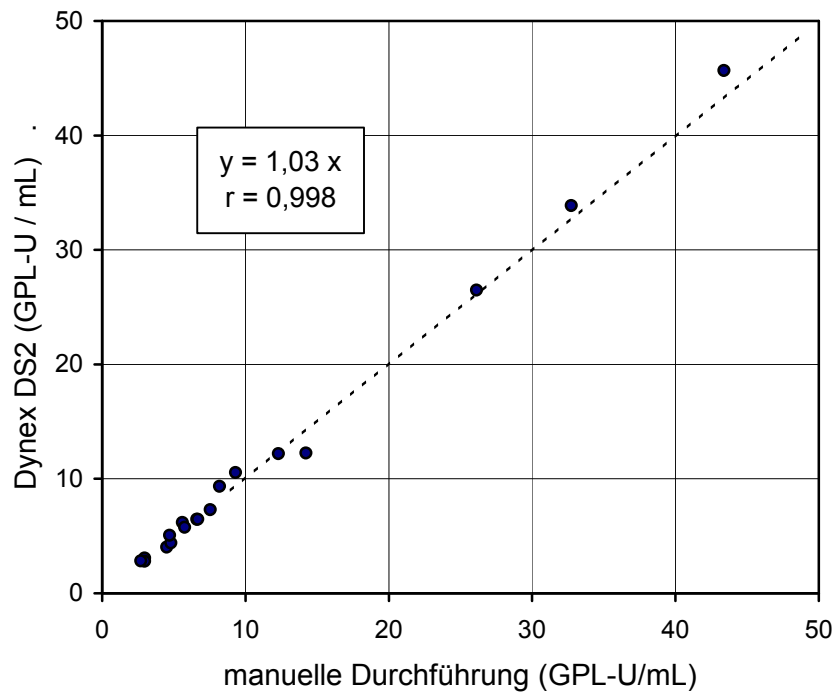
0411FE00.FED/HaufgPlotV1010J

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 = 1,8 %	mittl. VK = 2,6 %
inter-Assay Variabilität (n = 48)	mittl. VK = 3,5 %	mittl. VK = 3,2 %

Standardkurve: abgebildet in Abschnitt 9

Korrelation:



0411FE00.FED/KorrDynexDS2-V1010J

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



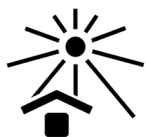
Enthält x Bestimmungen



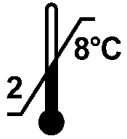
Für *in vitro* diagnostische Anwendung



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 β 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- β 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. 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 μ L Waschpuffer waschen. Dann je 100 μ 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 μ L Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 μ L des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 μ L des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 μ 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 (GPL-UmL) 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.