

Instructions for Use

EULISA β 2-Glycoprotein-1 IgG

Intended Use

Enzyme immunoassay for the detection of autoantibodies IgG against β 2-Glycoprotein-1

Micro titration 96 wells
Store kit at +2-8°C
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0211-02

March, 2015

EULISA β 2-Glycoprotein-1 IgG

English: page1
Deutsch: Seite20
Svenska: sida.....40

REF 212496

IVD



96

Contents

1. Introduction and background
2. Warnings and precautions
3. Principle of the test
4. Contents of the kit
5. Materials required but not supplied
6. Storage of the kit
7. Reagent and sample preparation / specimen requirements
8. Assay procedure
 - 8.1. Manual operation
 - 8.2. Dynex DS2 automated ELISA system
9. Evaluation and quality control
10. Interpretation of results / limitations of the procedure
11. Performance characteristics
 - 11.1. Standardisation
 - 11.2. Analytical specificity
 - 11.3. Detection limit (analytical sensitivity)
 - 11.4. Homogeneity of the solid phase
 - 11.5. Linearity
 - 11.6. Precision
 - 11.7. Frequency distribution of β 2-GP-1-Ab (IgG)
 - 11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system
12. Warranty
13. Symbols
14. References
15. Summary flow chart

The product described herein has been manufactured in compliance with IVD directive 98/79/EG.

1. Introduction and background

The anti-phospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder which can comprise clinical conditions as venous and arterial thrombosis, thrombocytopenia, myocardial infarction, recurrent spontaneous abortion and neurological complications (1, 2, 3).

Cardiolipin (CL) is the most common, negatively charged, acid phospholipid. Autoantibodies correlated with APS are directed not only against CL and similar phospholipides but also against phospholipid/protein complexes. β 2-glycoprotein 1 (β 2-GP-1; = apolipoprotein H) has been identified as such a natural and essential co-antigen for CL-autoantibodies (4, 5). The occurrence of CL/ β 2-GP-1 autoantibodies is associated with a tendency towards thromboses (3). Besides this diagnostic significance, these antibodies are believed to be directly involved in the pathogenesis of APS (6, 7, 8).

The present enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) is intended for the quantitative or qualitative determination of IgG antibodies in human serum, directed against β 2-GP-1. The immobilised antigen is a highly purified preparation of human β 2-GP-1. The test is fast (incubation time 30 - 30 - 30 minutes) and flexible (divisible solid phase, ready-to-use reagents). Six calibrators allow quantitative measurements; a negative and a positive control check the assay performance.

2. Warnings and precautions

The test kit is intended for in vitro diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Adherence to the protocol is strongly recommended.

The sample buffer, calibrators and controls contain Na-azide as preservative. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate contains 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The stop solution, 0,2 M sulfuric acid (H₂SO₄), is acidic and corrosive.

The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or

mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.

Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.

The calibrators and controls contain components of human origin. They have produced negative results when tested for Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag, HIV 1/2-Ab and hepatitis C Virus (HCV)-Ab, in FDA-approved or European Directive 98/79/EG-compliant tests. However, no known test can guarantee that products derived from human blood will not be infectious. They should therefore be handled as if capable of transmitting infectious agents, and discarded appropriately. Please refer to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local/national guidelines on laboratory safety and decontamination procedures. Safety data sheet for all hazardous components contained in this kit is available on request from Euro Diagnostica.

3. Principle of the test

The wells of the solid phase are coated with β 2-GP-1. On this surface, the following immunological reactions take place:

1st reaction: β 2-GP-1-specific antibodies present in the sample bind to the immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.

2nd reaction: A second antibody, directed at human IgG antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.

3rd reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development reflects the concentration of β 2-GP-1 antibodies (IgG) in the sample.

4. Contents of the kit

a. 1 microwell plate, coated with β 2-GP-1 and hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, each of which can be broken into 8 individual wells.

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

- b. Sample buffer, 100 mL, ready-to-use, orange coloured. Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and Na-azide.

| | |
|------------|------------|
| BUF | SPL |
|------------|------------|

- c. Wash buffer, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured. Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.

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

- d. 6 calibrators, 2,0 mL each, 0 - 3,0 - 8,0 - 18 - 45 and 100 U β 2-GP-1 antibodies (IgG) / mL, ready-to-use, gradually blue coloured. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

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

- e. Negative and positive control, 2,0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively. Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

| | |
|----------------|----------|
| CONTROL | - |
|----------------|----------|

| | |
|----------------|----------|
| CONTROL | + |
|----------------|----------|

- f. Anti-human IgG HRP conjugate, 14 mL, ready-to-use, red coloured. Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.

| | |
|-------------|------------|
| CONJ | IgG |
|-------------|------------|

- g. Substrate solution, 14 mL, ready-to-use, colourless. Contains a buffered solution of TMB and H₂O₂. Contained in a vial impermeable to light.

| | |
|-------------|------------|
| SUBS | TMB |
|-------------|------------|

- h. Stop solution (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, colourless, ready-to-use. Caution: sulfuric acid is corrosive.

| | |
|-------------|-------------|
| SOLN | STOP |
|-------------|-------------|

- i. Directions for use
- j. Lot-specific certificate of analysis

5. Materials required but not supplied

- a. Deionised or distilled water
- b. Graduated cylinder, 1000 mL
- c. Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
- d. Pipettes for 10, 100 and 1000 μL (1- and 8-channel pipettes recommended)
- e. Microwell plate washer (optional)
- f. Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
- g. ELISA evaluation program (recommended)

6. Storage of the kit

Store kit at 2 - 8°C. It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

7. Reagent and sample preparation / specimen requirements

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions.

- a. Before opening the pouch of the solid phase, it must have reached room temperature. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.

- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 - 8°C).
- c. Preparation of the samples: Handle patient specimens as if capable of transmitting infectious agents. Prepare sera using normal laboratory techniques and dilute them 1/100, e.g. 10 µL serum + 990 µL sample buffer. Mix thoroughly.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the calibrators, controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 - 8°C and assayed within 3 days. For longer storage, -20°C or lower temperature are recommended. Repeated freezing and thawing of sera should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

Specimen requirements: Highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated sera may cause erroneous results and should be avoided.

8. Assay procedure

8.1. Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 ± 3°C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- a. Immediately prior to use, wash the solid phase once: fill wells with 350 µL wash buffer each, soak for about 10 seconds in the wells and remove.
- b. Dispense the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue), controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and the diluted samples rapidly into the microwells; 100 µL per well. Duplicate measurements are recommended.

Incubate the plate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^\circ\text{C}$).

- c. Wash the wells 4 times as in step a.
- d. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the conjugate (14 mL, ready-to-use, red); 100 μL per well. Incubate the plate as in step b.
- e. Repeat wash step c.
- f. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the substrate solution (14 mL, ready-to-use, colourless, black vial); 100 μL per well. Incubate the plate as in step b. As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.
- g. Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless. Caution: corrosive!); 100 μL per well. Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- h. Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

Store the remainder of the reagents refrigerated ($2 - 8^\circ\text{C}$) if they are to be used again.

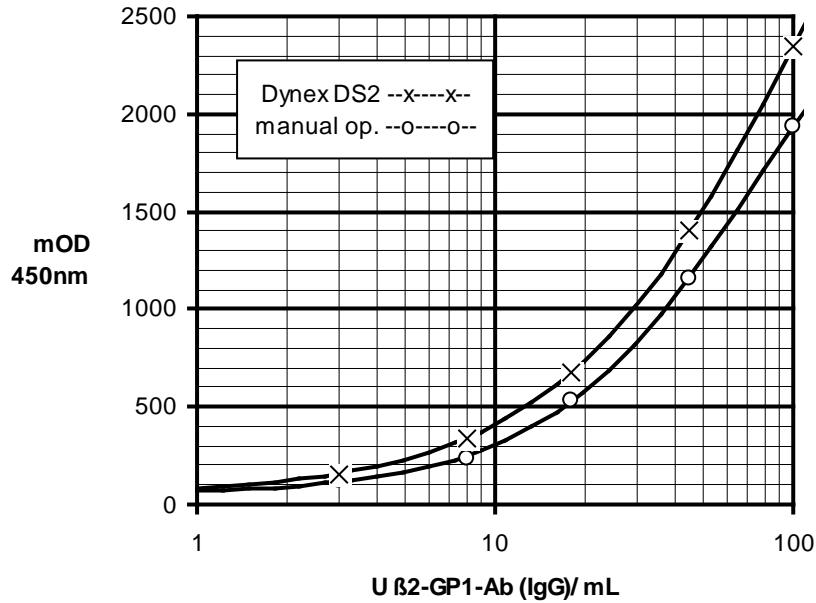
8.2. Dynex DS2 automated ELISA system

This product has been validated for use with the Dynex DS2 automated ELISA system. A suitable program file for assay execution and evaluation is available on request. The parameters of this program are merely a proposal and may need to be adapted by the operator to the requirements of the actual assay. In general terms, we have attempted to stick as close as possible to the protocol of manual operation, as above. However, due to the necessarily elevated temperature within the DS2, the substrate incubation period had to be shortened. Article 11.8. gives a performance comparison between manual assay operation and the DS2 ELISA system.

9. Evaluation and quality control

Quantitative evaluation: The data obtained are quantitatively evaluated with the standard curve, as shown below. However, the depicted curve can only serve as a model. It can not substitute the measurement of the calibrators, together

with the controls and actual samples. The curve has been constructed with a conventional ELISA evaluation program, using a 4-parameter function. The Spline approximation is also appropriate.



0711FE00.FED/StdKurveV0712J

If no computer-supported evaluation is possible, the standard curve may be drawn by hand. It allows transformation of the absorbance value of a sample into its concentration, i.e. into U β2-GP-1 antibodies (IgG) per mL serum.

Qualitative evaluation: The test may also be evaluated in a qualitative manner. This requires measurement of the positive control only. Nevertheless, measurement and examination of the negative control is recommended (see below: quality control).

In qualitative test evaluation, the absorbance of the samples is compared with the borderline absorbance (= cut-off). It is determined according to the following formula:

$$\text{absorbanceborderline} = \text{absorbancepositive control} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is quoted in the lot-specific certificate of analysis which is included with each test kit. Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbancepositive control} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0,35 \\ \text{absorbanceborderline} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of how positive a particular sample is for β 2-GP-1-Ab (IgG), one may calculate the ratio, according to the formula:

$$\text{ratio} = \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{borderline}}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance}_{\text{sample}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Quality control: The positive and negative control check the assay performance. Their authorised values and acceptable ranges, respectively, are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls have to fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

10. Interpretation of results / limitations of the procedure

Based on the measurement of a blood donor and a positive collective of sera (see below), we suggest for the assessment of patient sera:

| | quantitative evaluation U β 2-GP-1-Ab (IgG) per mL serum | qualitative evaluation ratio |
|-------------------------|--|---------------------------------|
| normal (negative) range | < 10,0 | < 0,84 |
| cut-off | 12,0 | 1,00 |
| equivocal range | 10,0 - 14,4 | 0,84 - 1,19 |
| positive range | > 14,4 | > 1,19 |

These specifications are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A negative test result indicates that the patient does not have an elevated level of IgG antibodies to β 2-GP-1. If nevertheless characteristic clinical signs of APS are observed, IgA/IgM antibodies directed at β 2-GP-1 and/or antibodies directed at CL should be determined.

A positive result should be considered as an indication for APS, as outlined in the beginning.

Specimens exhibiting results between the borderlines quoted above should be considered as equivocal and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

11. Performance characteristics

11.1. Standardisation

The test is standardised with a purified serum preparation containing IgG antibodies specifically directed at β 2-GP-1. This preparation is calibrated against the "DeBari" standard serum (9). The degree of sample reactivity is measured in relative ("DeBari")-units (U β 2-GP-1-Ab (IgG)/mL).

11.2. Analytical specificity

The test permits the specific determination of human IgG antibodies directed against β 2-GP-1.

11.3. Detection limit (analytical sensitivity)

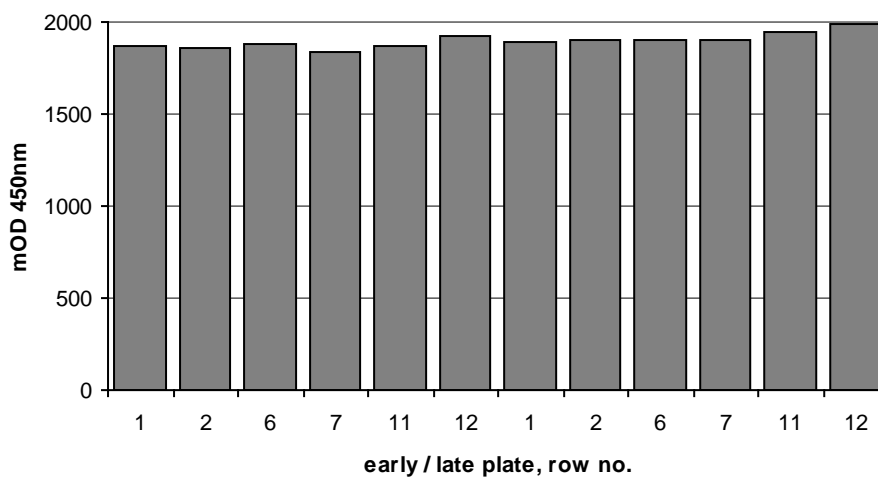
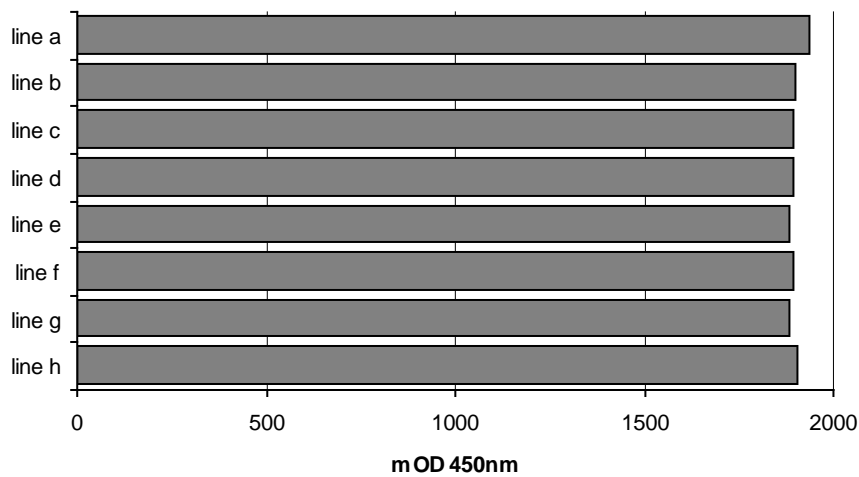
The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as $< 0,5$ U β 2-GP-1-Ab (IgG) per mL serum (n = 24).

Recommended measuring range: 2 - 100 U β 2-GP-1-Ab (IgG) per mL serum

11.4. Homogeneity of the solid phase

Measurement of the solid phase homogeneity is regular QC part of each production lot. This is determined by 288-fold measurement of a IgG-positive but non-saturating sample on 3 selected plates. Acceptance criterion: mOD-coefficient of variation (cv) over the plates $< 8\%$. The figure below shows a representative excerpt (solid phase lot no. 1002D) of such an analysis.

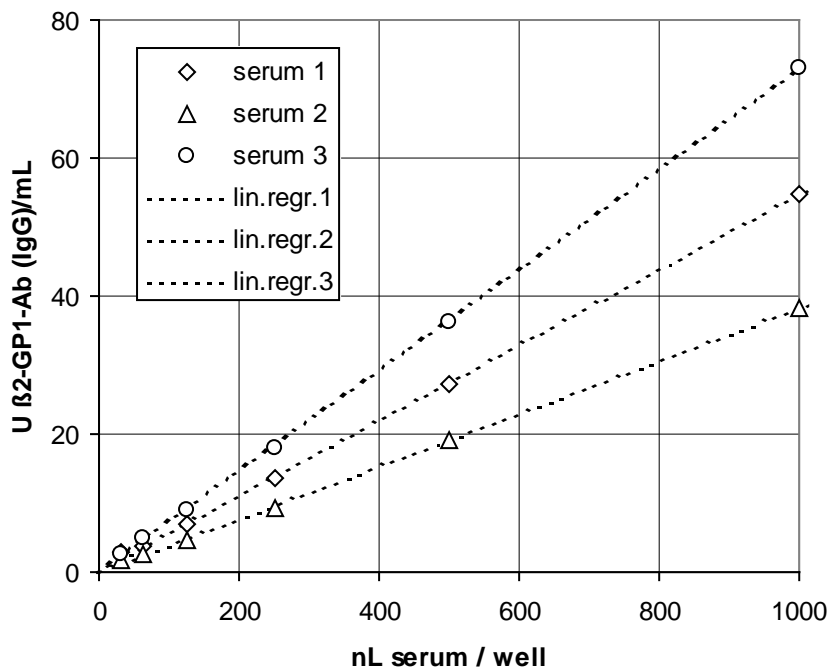
| plate | early (n/10) | | | | | | late (9n/10) | | | | | | mean | cv% |
|--------|--------------|------|------|------|------|------|--------------|------|------|------|------|------|-------------|-----|
| row | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | | |
| line a | 1883 | 1862 | 1896 | 1887 | 1907 | 1958 | 1929 | 1941 | 1961 | 1929 | 2003 | 2054 | 1934 | 2,8 |
| line b | 1849 | 1826 | 1834 | 1833 | 1879 | 1919 | 1917 | 1915 | 1928 | 1909 | 1959 | 2018 | 1899 | 3,0 |
| line c | 1864 | 1841 | 1861 | 1825 | 1880 | 1918 | 1899 | 1881 | 1898 | 1918 | 1954 | 2019 | 1897 | 2,8 |
| line d | 1858 | 1825 | 1835 | 1816 | 1876 | 1935 | 1891 | 1916 | 1910 | 1912 | 1965 | 1991 | 1894 | 2,9 |
| line e | 1843 | 1816 | 1851 | 1814 | 1852 | 1929 | 1888 | 1900 | 1897 | 1909 | 1928 | 1973 | 1883 | 2,6 |
| line f | 1874 | 1901 | 1910 | 1860 | 1872 | 1908 | 1867 | 1892 | 1884 | 1900 | 1923 | 1952 | 1895 | 1,4 |
| line g | 1881 | 1913 | 1920 | 1827 | 1854 | 1896 | 1856 | 1877 | 1874 | 1880 | 1911 | 1930 | 1885 | 1,6 |
| line h | 1932 | 1918 | 1912 | 1822 | 1865 | 1959 | 1883 | 1926 | 1865 | 1878 | 1906 | 1989 | 1905 | 2,4 |
| mean | 1873 | 1863 | 1877 | 1836 | 1873 | 1928 | 1891 | 1906 | 1902 | 1904 | 1944 | 1991 | 1899 | |
| cv% | 1,5 | 2,3 | 1,9 | 1,4 | 0,9 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,6 | 0,9 | 1,7 | 2,0 | 2,5 | |



0711FE00.FED/FphHomV0712J

11.5. Linearity

In order to assess the dose-response relationship of the test, positive sera were measured in serial 2-fold dilution. Acceptance criterion: linear regression of 4 successive dilutions must yield a correlation factor > 0,98. A typical result is depicted below.



0711FE00.FED/LinearV0712J

11.6. Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined: a. within 1 assay and between 3 assays, b. between 3 operators and c. between 2 kit lots.

a. Intra- and inter-assay variability (n = 24 and 72, respectively)

| sample | mean U/mL | variability (cv, %) | |
|--------|--------------|---------------------|-------------|
| | | intra-assay | inter-assay |
| 1 | 12 | 4,8 | 5,2 |
| 2 | 20 | 4,3 | 5,0 |
| 3 | 43 | 6,4 | 7,4 |

b. Operator to operator variability (n = 12)

| sample | mean U/mL | variability (cv, %) |
|--------|--------------|------------------------|
| 1 | 14 | 3,9 |
| 2 | 25 | 3,3 |
| 3 | 43 | 2,3 |

c. Variability between 2 kit lots (n = 6)

| sample | mean U/mL | variability (cv, %) |
|--------|--------------|------------------------|
| 1 | 15 | 10,0 |
| 2 | 25 | 8,5 |
| 3 | 52 | 10,4 |

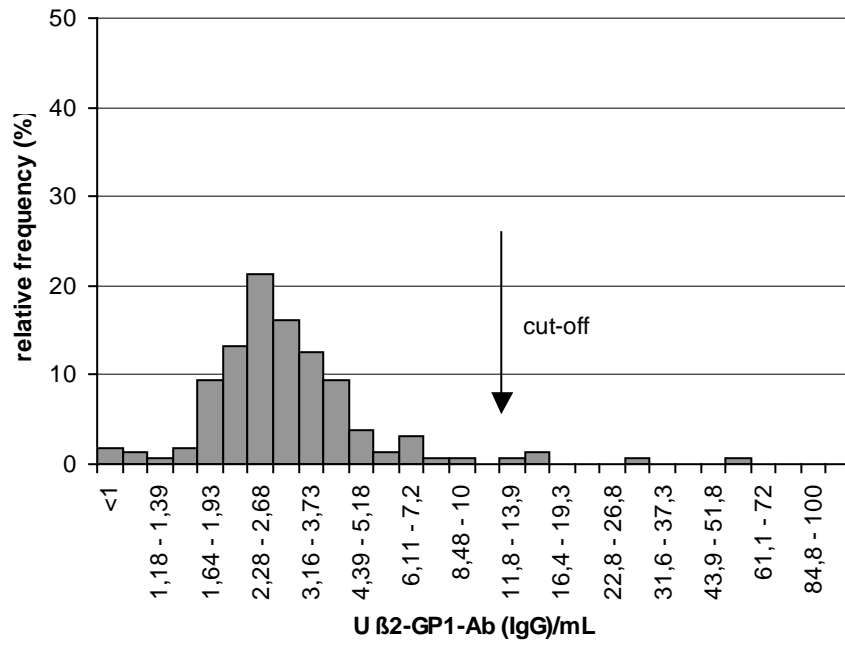
11.7. Frequency distribution of β 2-GP-1-Ab (IgG)

This was analysed in a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age, and a collective of positive sera according to a CE-compliant reference ELISA. The following distribution of the analyte was observed:

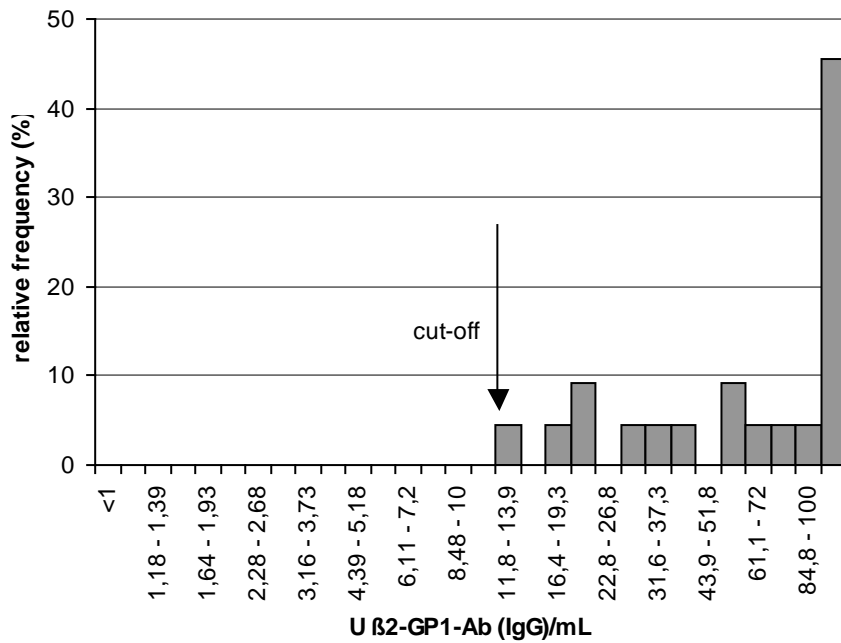
| | | | |
|------------------------------|-----------|-----------------------------|----------|
| blood donor sera | | positive sera | |
| n: | 160 | n: | 22 |
| mean: | 3,7 U/mL | mean: | 130 U/mL |
| mean + s: | 8,6 U/mL | mean - s: | < 0 U/mL |
| mean + 2s: | 13,5 U/mL | mean - 2s: | < 0 U/mL |
| median: | 2,7 U/mL | median: | 88 U/mL |
| 95 th percentile: | 6,7 U/mL | 5 th percentile: | 18 U/mL |

ROC-analysis of these data was used to determine the cut-off as 12,0 U β 2-GP-1-Ab (IgG)/mL (10). The data presented here suggest a diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA of about 97 and nearly 100 %, respectively. These values apply for the measured sera only; other collectives may yield different results.

blood donor sera



positive sera



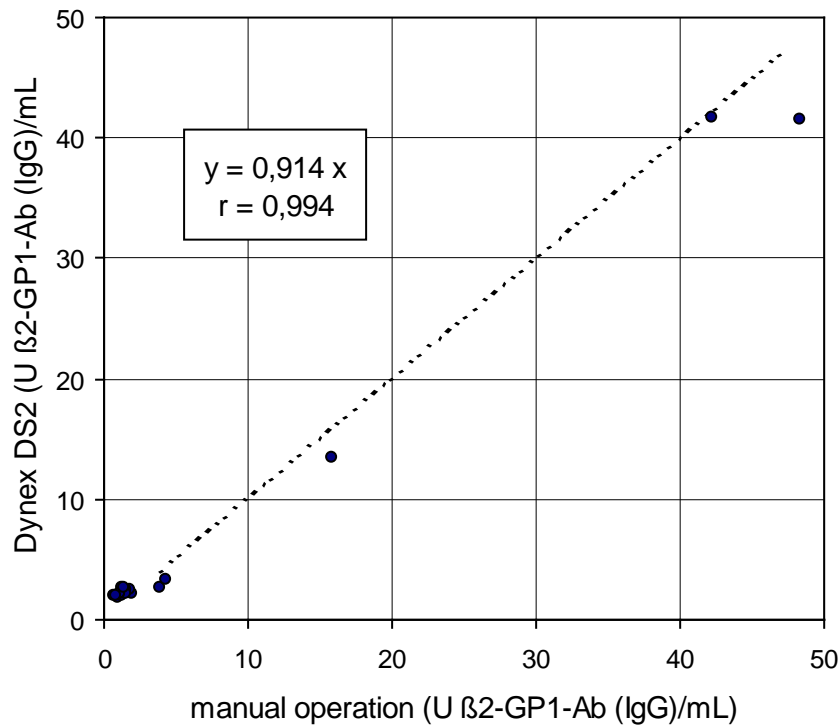
11.8. Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

Variability: Using specimen of one and the same kit lot, the variability of assay results were compared between manual operation and the Dynex DS2 automated ELISA system:

| | manual operation | Dynex DS2 |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|
| intra-assay variability (n = 16) | mean cv = 1,7 % | mean cv = 1,7 % |
| inter-assay variability (n = 48) | mean cv = 1,9 % | mean cv = 2,6 % |

Standard curve: depicted in article 9

Correlation:



0711FE00.FED/KorrDynexDS2-V0712J

12. Warranty

Euro Diagnostica AB guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given.

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case Euro Diagnostica AB disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, Euro Diagnostica AB accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

13. Symbols



Catalogue number



Batch code



Contains sufficient for $\langle n \rangle$ tests



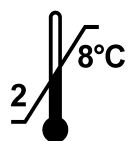
In vitro diagnostic medical device



Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive



Keep away from sunlight



Temperature limit



Use-by date



Consult instructions for use



Biological risks



Manufacturer

14. References

1. Gromnica-Ihle, E., and 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 β 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. 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
9. Erickson, E. N., et al.: Reference calibrators for IgG antibodies to β 2-GP-1: Preparation, properties, and availability to investigators. *Clin. Chem.* 42 (1996), 1116-1117
10. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

15. Summary flow chart

- a. Dilute the sera 1/100 in sample buffer (100 mL, ready-to-use, orange) and mix.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with water and mix.
- c. Wash the wells once with 350 μ L wash buffer each. Dispense 100 μ L of the calibrators (2,0 mL each, ready-to-use, gradually blue) and controls (2,0 mL each, ready-to-use, green and red) and of the diluted samples into the wells of the solid phase. Duplicate measurements are recommended. Incubate for 30 minutes at room temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- d. Wash the wells 4 times with 350 μ L wash buffer each.
- e. Dispense 100 μ L of the conjugate (14 mL, ready-to-use, red) into the wells. Incubate as in step c.
- f. Repeat washing step d.
- g. Dispense 100 μ L of the substrate solution (14 mL, ready-to-use, black vial) per well. Incubate as in step c. Then, add 100 μ L stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless) per well and agitate the plate briefly.
- h. Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- i. Quantitative evaluation: Determine the standard curve and, using this curve, transform the absorbance of the samples into their respective antibody concentration (U/mL).
- j. Qualitative evaluation: Determine the borderline absorbance by multiplying the absorbance of the positive control with the factor shown in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the samples by dividing their absorbance by the borderline absorbance.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

Gebrauchsanweisung

EULISA β 2-Glycoprotein-1 IgG

Verwendungszweck

Enzym-Immunoassay zum Nachweis von
IgG-Autoantikörpern gegen β 2-Glycoprotein-1

Mikrotitration 96 Kavitäten
Kit bei +2-8°C lagern
Nur für in vitro-diagnostische Anwendung



Dokument No. E-23-0211-02

März, 2015

EULISA β 2-Glycoprotein-1 IgG

Deutsch

REF 212496

IVD



96

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
 - 8.3. Manuelle Durchführung
 - 8.4. 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 β 2-GP-1-AK (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 wurde in Übereinstimmung mit der IVD-Direktive 98/79/EG hergestellt.

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. β 2-Glycoprotein 1 (β 2-GP-1; = Apolipoprotein H) ist ein derartiges natürliches und essentielles Co-Antigen für CL-Autoantikörper (4, 5). Das Auftreten von CL/ β 2-GP-1 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, 8).

Der vorliegende Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist dazu bestimmt, Antikörper (IgG) gegen β 2-GP-1 in menschlichem Serum quantitativ oder qualitativ zu bestimmen. Das immobilisierte Antigen ist ein hochgereinigtes, humanes β 2-GP-1-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.

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

Probenpuffer, Standards und Kontrollen enthalten Na-Azid als Präservativ. Der Waschpuffer enthält Bromonitrodioxan als Präservativ, 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, gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung. Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.

3. Testprinzip

Die Kavitäten der Festphase sind beschichtet mit β 2-GP-1. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: β 2-GP-1-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 β 2-GP-1-Antikörpern (IgG) in der Probe wider.

4. Inhalt des Testkits

- a. 1 Mikrowell-Platte, beschichtet mit β 2-GP-1 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 U β 2-GP-1-Antikörper (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 H_2O_2 , abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

| | |
|-------------|------------|
| SUBS | TMB |
|-------------|------------|

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



- 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.

- 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. Sie 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.

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

8. Durchführung des Tests

8.1. Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) 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.

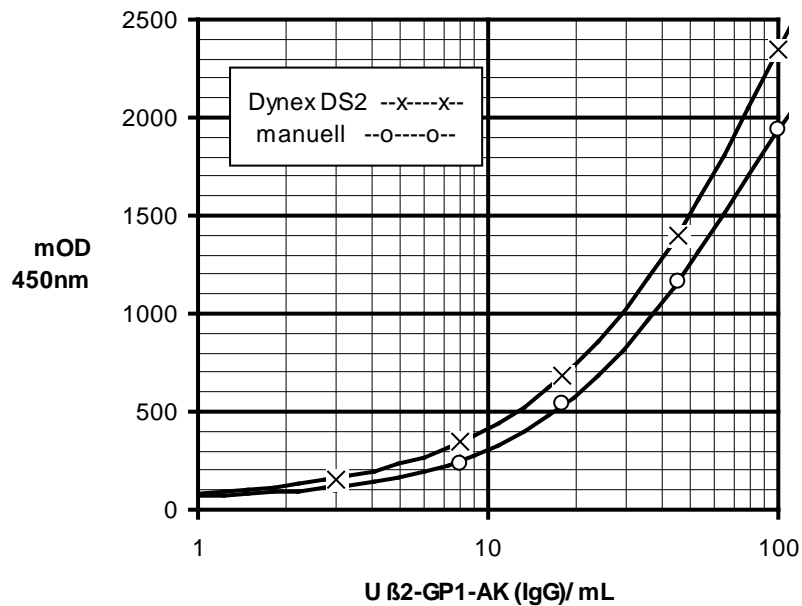
Überschüssige Reagenzien weiter bei 2 - 8°C lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

8.2. Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine entsprechende Programmdatei für die Assay-Durchführung und Auswertung kann 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-GP-1-AK (IgG) / mL Serum).

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 β 2-GP-1-AK (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 Chargen-spezifischen 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 β 2-GP-1-AK (IgG) / mL Serum | 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 β 2-GP-1 aufweist. Sind jedoch charakteristische klinische Anzeichen des APS erkennbar, sollten IgA/IgM-Antikörper gegen β 2-GP-1 und/oder Antikörper gegen CL 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 β 2-GP-1 gerichtete IgG-Antikörper enthält. Es wird seinerseits kalibriert am "DeBari"-Standardserum (9). Der Reaktivitätsgrad einer Probe wird in relativen ("DeBari")-Einheiten (U β 2-GP-1-AK (IgG)/mL Serum) angegeben.

11.2. Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch humane IgG-Antikörper nach, die gegen β 2-GP-1 gerichtet sind.

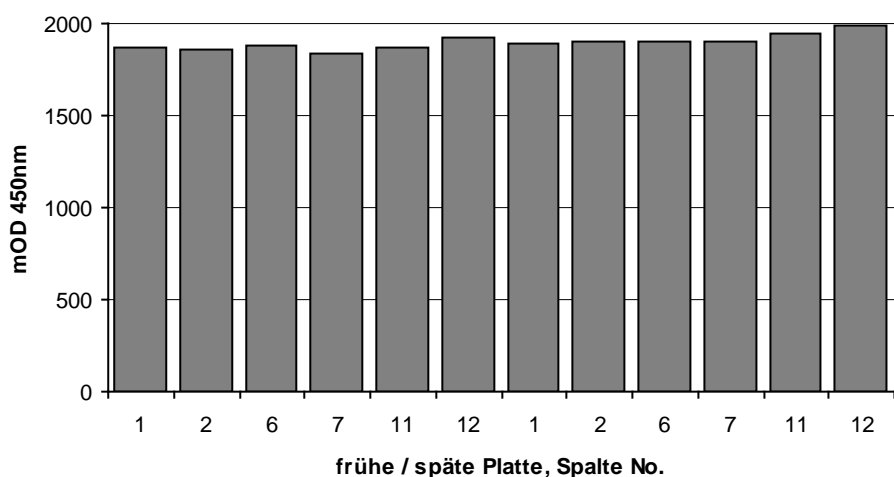
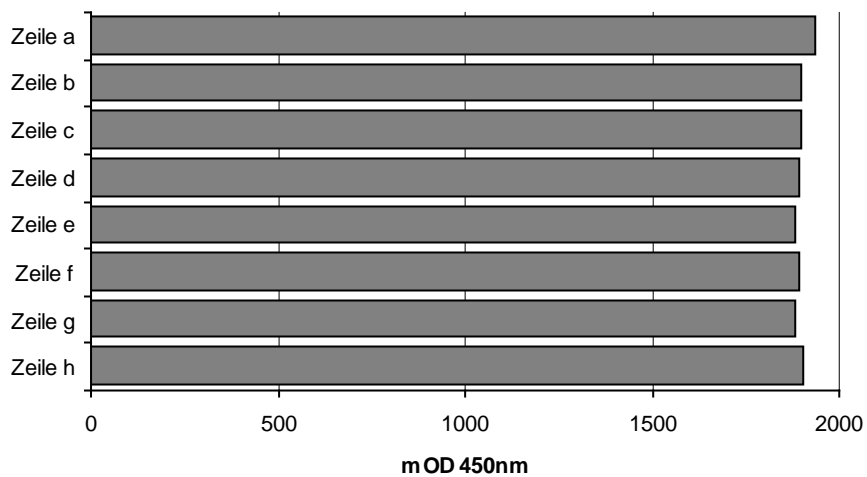
11.3. Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

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 β 2-GP-1-AK (IgG)/mL Serum bestimmt (n = 24). Empfohlener Messbereich: 2 - 100 U β 2-GP-1-AK (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: 1002D).

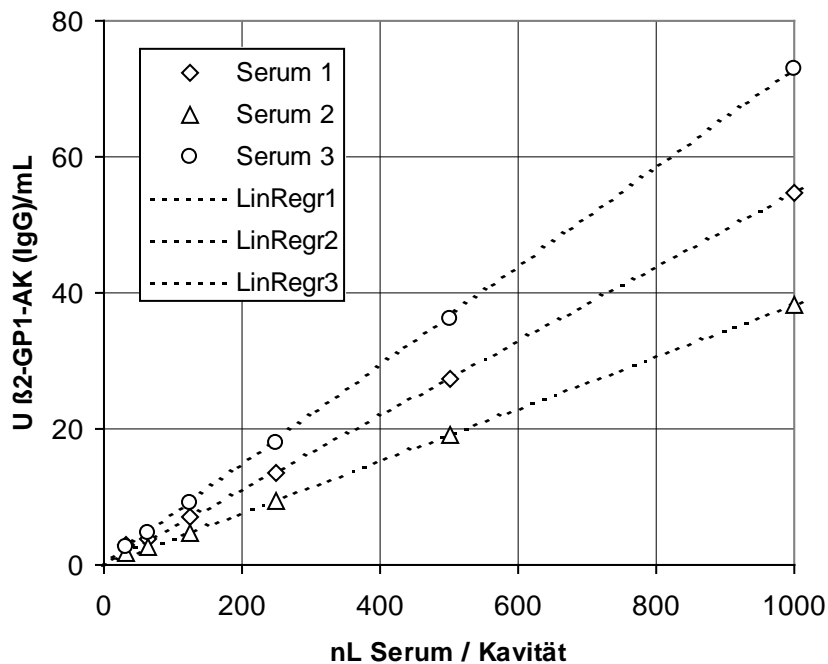
| Platte | früh (n/10) | | | | | | spät (9n/10) | | | | | | MW | VK % |
|---------|-------------|------|------|------|------|------|--------------|------|------|------|------|------|-------------|------------|
| | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | | |
| Zeile a | 1883 | 1862 | 1896 | 1887 | 1907 | 1958 | 1929 | 1941 | 1961 | 1929 | 2003 | 2054 | 1934 | 2,8 |
| Zeile b | 1849 | 1826 | 1834 | 1833 | 1879 | 1919 | 1917 | 1915 | 1928 | 1909 | 1959 | 2018 | 1899 | 3,0 |
| Zeile c | 1864 | 1841 | 1861 | 1825 | 1880 | 1918 | 1899 | 1881 | 1898 | 1918 | 1954 | 2019 | 1897 | 2,8 |
| Zeile d | 1858 | 1825 | 1835 | 1816 | 1876 | 1935 | 1891 | 1916 | 1910 | 1912 | 1965 | 1991 | 1894 | 2,9 |
| Zeile e | 1843 | 1816 | 1851 | 1814 | 1852 | 1929 | 1888 | 1900 | 1897 | 1909 | 1928 | 1973 | 1883 | 2,6 |
| Zeile f | 1874 | 1901 | 1910 | 1860 | 1872 | 1908 | 1867 | 1892 | 1884 | 1900 | 1923 | 1952 | 1895 | 1,4 |
| Zeile g | 1881 | 1913 | 1920 | 1827 | 1854 | 1896 | 1856 | 1877 | 1874 | 1880 | 1911 | 1930 | 1885 | 1,6 |
| Zeile h | 1932 | 1918 | 1912 | 1822 | 1865 | 1959 | 1883 | 1926 | 1865 | 1878 | 1906 | 1989 | 1905 | 2,4 |
| MW | 1873 | 1863 | 1877 | 1836 | 1873 | 1928 | 1891 | 1906 | 1902 | 1904 | 1944 | 1991 | 1899 | |
| VK % | 1,5 | 2,3 | 1,9 | 1,4 | 0,9 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,6 | 0,9 | 1,7 | 2,0 | | 2,5 |



0711FE00.FED/FphHomV0712J

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 |

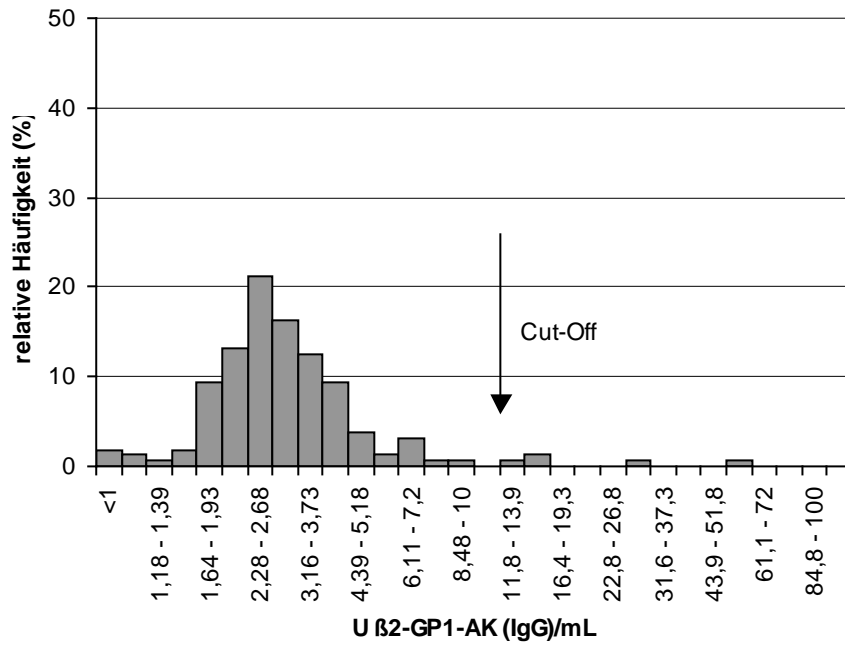
11.7. Häufigkeitsverteilung von β 2-GP-1-AK (IgG)

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:

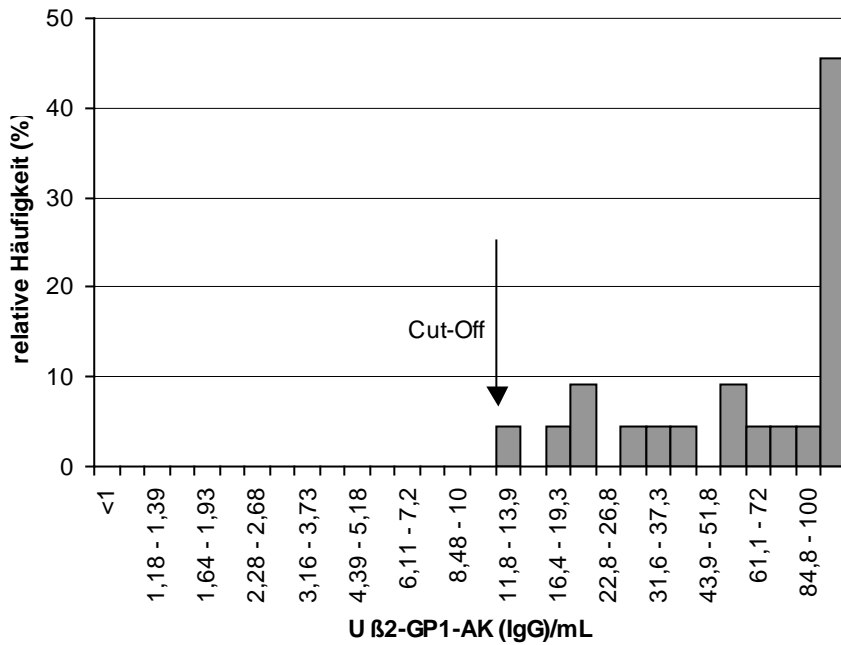
| | | | |
|-------------------|-----------|----------------|----------|
| Blutspender-Seren | | positive Seren | |
| n: | 160 | n: | 22 |
| MW: | 3,7 U/mL | MW: | 130 U/mL |
| MW + s: | 8,6 U/mL | MW - s: | < 0 U/mL |
| MW + 2s: | 13,5 U/mL | MW - 2s: | < 0 U/mL |
| Median: | 2,7 U/mL | Median: | 88 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 β 2-GP-1-AK (IgG)/mL bestimmt (10). 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.

Blutspender-Seren



Positiv-Seren



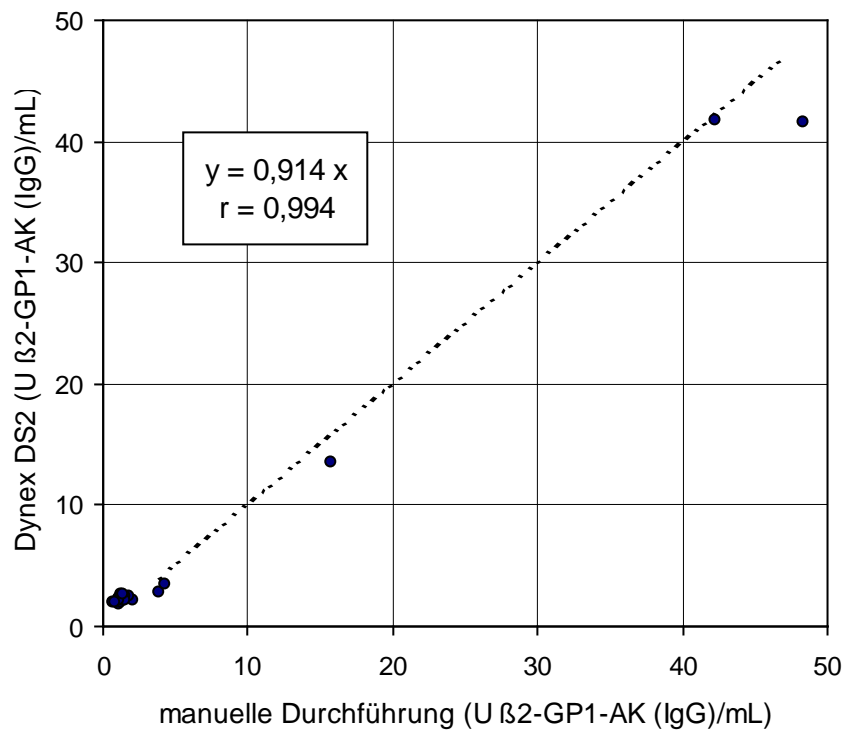
0711FE00.FEDHäufigPlotV07121J

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/Korr/DynexDS2-V0712J

12. Garantie und Haftung

Euro Diagnostica AB 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 Euro Diagnostica AB jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann Euro Diagnostica AB keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13. Symbole



Artikelnummer



Chargencode



Ausreichend für $\langle n \rangle$ Prüfungen



In-vitro-Diagnostikum



Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu *In-vitro*-Diagnostika



Von Sonnenlicht fernhalten



Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten



Biologische Risiken



Hersteller

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 β 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. 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
9. Erickson, E. N., et al.: Reference calibrators for IgG antibodies to β 2-GP-1: Preparation, properties, and availability to investigators. *Clin. Chem.* 42 (1996), 1116-1117
10. 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 Seren 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 µL Waschpuffer waschen. Dann je 100 µL 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 µL Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 µL des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 µL des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 µL 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 β 2-GP-1-AK (IgG)/mL Serum) 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.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

Bruksanvisning

EULISA B2-Glycoprotein-1 IgG

Avsedd användning

Enzymimmunoanalys för detektering av
autoantikroppar IgG mot Glycoprotein-1

Mikrotitrering, 96 brunnar
Förvara kitet vid +2-8 °C
Endast för in vitro-diagnostik.



Dokument nr. E-23-0211-02

Mars, 2015

EULISA B2-Glycoprotein-1 IgG

Svenska



212496



96

Innehåll

1. Introduktion och bakgrund
2. Varningar och försiktighetsåtgärder
3. Testprincip
4. Kitets innehåll
5. Material som krävs men som inte ingår
6. Förvaring av kitet
7. Reagens- och provberedning / provkrav
8. Analysmetod
 - 8.5. Manuell användning
 - 8.6. Dynex DS2 automatiskt ELISA-system
9. Utvärdering och kvalitetskontroll
10. Tolkning av resultat / metodens begränsningar
11. Prestanda
 - 11.1. Standardisering
 - 11.2. Analytisk specificitet
 - 11.3. Detektionsgräns (analytisk sensitivitet)
 - 11.4. Homogenitet i fast fas
 - 11.5. Linjäritet
 - 11.6. Precision
 - 11.7. Frekvensdistribution av β 2-GP-1-Ab (IgG)
 - 11.8. Manuell drift jämfört med Dynex DS2 automatiskt ELISA-system
12. Garanti
13. Symboler
14. Referenser
15. Sammanfattande flödesschema

Den produkt som beskrivs i detta dokument har tillverkats i enlighet med IVD-direktivet 98/79/EG.

1. Introduktion och bakgrund

Antifosfolipidsyndrom (APS) är en autoimmunsjukdom som kännetecknas av kliniska tillstånd såsom venös, och arteriell trombos, trombocytopeni, myokardinfarkt, återkommande spontan abort och neurologiska komplikationer (1, 2, 3).

Kardiolipin (CL) är den vanligaste, negativt laddade, sura fosforlipiden. Autoantikroppar som korreleras med APS riktas inte endast mot CL och liknande fosfolipider, utan även mot fosfolipid-/proteinkomplex. β 2-glykoprotein 1 (β 2-GP-1; = apolipoprotein H) har identifierats som en sådan naturlig och essentiell co-antigen för CL-antikroppar (4, 5). Förekomst av CL/ β 2-GP-1-autoantikroppar förknippas med trombosbenägenhet (3). Förutom denna diagnostiska signifikans, anses dessa antikroppar vara direkt involverade i patogenesen för APS (6, 7).

Den aktuella enzymkopplade immunadsorberande analysen (ELISA) är avsedd för kvantitativ eller kvalitativ bestämning av IgG-antikroppar i humant serum, riktade mot β 2-GP-1. Den immobiliserade antigenen är en högrenad preparation av humant β 2-GP-1. Testet är snabbt (inkubationstid 30 - 30 - 30 minuter) och flexibelt (delbar fast fas, reagenser som är klara att användas). Sex kalibratorer möjliggör kvantitativa mätningar; en negativ och en positiv kontroll kontrollerar analysprestandan.

2. Varningar och försiktighetsåtgärder

Testkitet är endast avsett för in vitro diagnostiskt bruk och får inte användas ii eller på människor eller djur.

Använd inte reagenser efter angivet utgångsdatum.

Vi rekommenderar starkt att protokollet följs.

Provbuffert, kalibratorer och kontroller innehåller natriumazid som konserveringsmedel. Tvättbufferten innehåller bromnitrodioxan och konjugatet innehåller metylisotiazolinon/bromnitrodioxan som konserveringsmedel. Substratet innehåller 3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidin (TMB) och väteperoxid (H_2O_2). Stopplösningen, 0,2 M svavelsyra (H_2SO_4), är sur och frätande.

Ovan angivna reagenser kan vara giftiga vid förtäring. Iakttag rutinmässiga försiktighetsåtgärder vid hantering av farliga kemikalier. Undvik all kontakt med kroppen, använd handskar och skyddsglasögon. Skölj grundligt med vatten, om

någon av reagenserna kommer i kontakt med hud eller slemhinnor. Pipettera aldrig med munnen. Kassera i enlighet med lokala/nationella föreskrifter.

Natriumazid kan reagera med bly- och kopparrör och bilda explosiva metallazider. Spola med stora mängder vatten vid kassering för att undvika ansamling av azider.

Kalibratorer och kontroller innehåller komponenter som med humant ursprung. De har visat negativa resultat vid tester för humant immunbristvirus (HIV)-ag, hepatit B yt-(HBs)-ag, HIV 1/2-ak samt hepatit C-virus (HCV)-ak, i tester som uppfyller FDA:s krav eller kraven i EU:s direktiv 98/79/EG. Det finns emellertid inga kända tester som kan garantera att produkter som härleds ur humant blod är fria från smittämnen. De måste därför hanteras som om de är smittbärande och kasseras på lämpligt sätt. Läs CDC:s (Center of Disease Control, Atlanta, USA) eller andra lokala/nationella riktlinjer beträffande laboratoriesäkerhet och dekontamineringsrutiner. Säkerhetsdatablad för alla farliga komponenter som finns i detta kit finns tillgängliga på begäran från Euro Diagnostica.

3. Testprincip

Brunnarna i den fasta fasen bestryks med β 2-GP-1. På denna yta kommer följande immunologiska reaktioner att äga rum:

- 1:a reaktionen: β 2-GP-1-specifika antikroppar i provet binder till det immobiliserade antigenet och bildar ett antigen-antikroppskomplex. Därefter tvättas obundna provkomponenter bort från den fasta fasen.
- 2:a reaktionen: En andra antikropp, riktad mot humana IgG-antikroppar och konjugerad med HRP (pepparrotsperoxid) tillsätts. Detta konjugat binds till komplexet. Därefter tvättas överflödigt konjugat bort från den fasta fasen.
- 3:e reaktionen: Det enzymmärkta komplexet omvandlar det färglösa substratet till en blå produkt. Graden av färgutveckling reflekterar koncentrationen av β 2-GP-1 -antikroppar (IgG) i provet.

4. Kitets innehåll

- a. 1 mikrobrunnspåse som belagts med β 2-GP-1 och förpackats hermetiskt i en folielaminatpåse tillsammans med en påse med torkmedel. Plattan består av 12 remsor som var och en kan delas upp i 8 enskilda brunnar.

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

- b. Provbuffert, 100 ml, klar att användas, orange. Innehåller trisbuffrad koksaltlösning (TBS), bovint serumalbumin (BSA), tween och natriumazid.

| | |
|------------|------------|
| BUF | SPL |
|------------|------------|

- c. Tvättbuffert, 100 ml, 10x-koncentrat, blå. Innehåller TBS, tween och bromnitrodioxan.

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

- d. 6 kalibratorer, 2,0 ml vardera, 0 - 3,0 - 8,0 - 18 - 45 och 100 U β 2-GP-1-antikroppar (IgG)/ml, klara att använda, gradvis blåfärgade. Innehåller TBS, BSA, tween och natriumazid.

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

- e. Negativ och positiv kontroll, 2,0 ml vardera, klara att använda, grön respektive röd. Innehåller TBS, BSA, tween och natriumazid.

| | |
|----------------|----------|
| CONTROL | - |
|----------------|----------|

| | |
|----------------|----------|
| CONTROL | + |
|----------------|----------|

- f. Anti-humant IgA HRP-konjugat, 14 ml, klart att använda, rött. Buffrad lösning som innehåller stabiliseringsprotein, metylisotiazolinon samt bromnitrodioxan.

| | |
|-------------|------------|
| CONJ | IgG |
|-------------|------------|

- g. Substratlösning, 14 ml, klar att använda, färglös. Innehåller en buffrad lösning av TMB och H₂O₂ i en flaska som är ogenomtränglig för ljus.

| | |
|-------------|------------|
| SUBS | TMB |
|-------------|------------|

- h. Stopplösning (0,2 M H₂SO₄), 14 ml, färglös, klar att användas. Varning: Svavelsyra är frätande.

| | |
|-------------|-------------|
| SOLN | STOP |
|-------------|-------------|

- i. Bruksanvisning

k. Lot-specifikt analyscertifikat

5. Material som krävs men som inte ingår

- a. Avjoniserat eller destillerat vatten
- b. Graderad cylinder, 1 000 ml
- c. Rör för provspädning (överföringsrör i mikrobrunnsplattans format rekommenderas)
- d. Pipetter för 10, 100 och 1 000 µl (pipetter med 1 och 8 kanaler rekommenderas)
- e. Tvätt för mikrobrunnsplatta (tillval)
- f. Fotometer för mikrobrunnsplatta, försedd med ett 450 nm filter
- g. ELISA utvärderingsprogram (rekommenderas)

6. Förvaring av kitet

Förvara kitet vid 2-8 °C. Det är stabilt fram till det utgångsdatum som anges på kartongens etikett. Använd inte kitet efter utgångsdatumet.

7. Reagens- och provberedning / provkrav

Komponenter från olika kit får inte bytas ut mot varandra eller slås samman, på grund av eventuella varierande frakt- eller lagringsförhållanden.

- a. Innan påsen med mikrotiterplattan öppnas måste den ha uppnått rumstemperatur. Ta ut de mikrobrunnar som inte behövs ur ramen och lägg omedelbart tillbaka dem i påsen, tillsammans med påsen med torkmedel. Återförsegla påsen hermetiskt och förvara den i kylan för framtida användning.
- b. Späd ut tvättbufferten (10x-koncentrat [100 ml, blå]) med 900 ml avjoniserat vatten. Blanda noga. Den utspädda bufferten är stabil i flera veckor vid förvaring i kylskåp (2-8 °C).

- c. Beredning av proverna: Hantera patientproverna som om de kan överföra smittämnen. Förbered sera med vedertagna laboriemetoder och späd 1/100, t.ex. 10 µl serum + 990 µl provbuffert. Blanda noga.

För snabb dispensering under analysen rekommenderas att kalibratorer, kontroller och prover förbereds i överföringsrör för mikrobrunn. Detta möjliggör användning av en pipett med 8 kanaler under analysen.

Om proverna inte analyseras omedelbart ska de förvaras vid 2-8 °C och analyseras inom 3 dagar. Vid längre förvaring rekommenderas en temperatur på -20 °C eller lägre. Upprepad frysning och upptining av sera bör undvikas. Upptinade prover måste blandas före spädning.

Provkrav: Sera med hög fetthalt eller sera som är hemolyserat eller mikrobiellt kontaminerat kan ge felaktiga resultat och bör undvikas.

8. Analysmetod

8.1. Manuell användning

Innan analysen påbörjas måste alla komponenter i kitet ha uppnått rumstemperatur (23 ± 3 °C).

För bästa resultat, d.v.s. maximalt förhållande mellan specifik signal och bakgrundssignal, är **noggrann tvätt** avgörande (steg a, c och e). Det är **av yttersta vikt att tvättilösningen avlägsnas helt och hållet**. För detta ändamål torika ordentligt plattan mot flera lager av absorberande papper. Automatiska tvättar måste verifieras mot resultat som uppnås med manuell tvätt.

- a. Precis före användning ska mikrobrunnarna tvättas en gång: fyll brunnarna med 350 µl tvättbuffert i varje, vänta i cirka 10 sekunder och avlägsna.
- b. Dispensera kalibratorerna (2,0 ml i varje, klara att användas, gradvis blå), kontrollerna (2,0 ml i varje, klara att användas, grön och röd) samt de utspädda proverna snabbt i mikrobrunnarna; 100 µl per brunn. Mätningar i duplikat rekommenderas.

Inkubera plattan i 30 minuter i rumstemperatur (23 ± 3 °C).

- c. Tvätta brunnarna 4 gånger som i steg a.

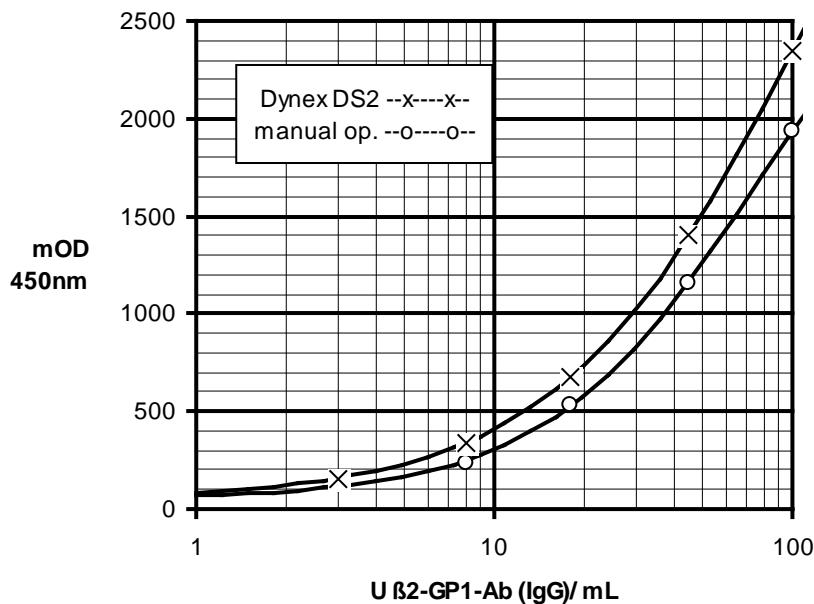
- d. Dispensera konjugatet (14 ml, klart att användas, rött) snabbt (företrädesvis med en pipett med 8 kanaler); 100 µl per brunn. Inkubera plattan som i steg b.
 - e. Upprepa tvättmomentet i steg c.
 - f. Dispensera substratlösningen (14 ml, klar att användas, färglös, svart flaska) snabbt (företrädesvis med en pipett med 8 kanaler); 100 µl per brunn. Inkubera plattan som i steg b. Eftersom substratet är ljuskänsligt bör exponering för intensivt ljus undvikas (t.ex. direkt solljus) under inkubationen.
 - g. Dispensera stopplösningen (14 ml, klar att användas, färglös. Varning: frätande!) snabbt (företrädesvis med en pipett med 8 kanaler); 100 µl per brunn. Använd samma sekvens som för substratet. Färgen ändras från blå till gul. Skaka plattan, företrädesvis på en orbital skakapparat i cirka 10 sekunder.
 - h. Läs omedelbart av absorbansen i mikrobrunnsplattans fotometer vid 450 nm.
- Förvara kvarstående reagenser i kyl (2-8 °C) om de ska användas igen.

8.2 Dynex DS2 automatiskt ELISA-system

Denna produkt har validerats för användning med Dynex DS2 automatiskt ELISA-system. En lämplig programfil för genomförande och utvärdering av analys tillhandahålls på begäran. Parametrarna i detta program är endast ett förslag och kan behöva anpassas av användaren till kraven i den faktiska analysen. Vi har generellt försökt att hålla oss så mycket som möjligt till protokollet vid en manuell användning, enligt ovan. Emellertid, på grund av en högre temperatur inuti DS2, inkubationstiden för substratet bör förkortas. Paragraf 11.8. innehåller en prestationsjämförelse mellan manuell analys och DS2 ELISA-systemet.

9. Utvärdering och kvalitetskontroll

Kvantitativ utvärdering: De data som erhålls utvärderas kvantitativt mot standardkurvan enligt nedan. Den kurva som visas är endast en modell. Den kan inte ersätta mätning av kalibratorer, tillsammans med kontroller och faktiska prov. Kurvan har konstruerats med ett konventionellt ELISA utvärderingsprogram, som använder 4 parameters funktion. Spline-approximering är också lämpligt.



0911FE00.FED/StdKurveV1410J

Om ingen datorstödd utvärdering är möjlig kan standardkurvan ritas för hand. Den möjliggör omvandling av absorbansvärdet i ett prov till dess koncentration, d.v.s. i U β2-GP-1-antikroppar (IgG) per ml serum.

Kvalitativ utvärdering: Testet kan även utvärderas kvalitativt. Detta kräver mätning av den endast positiva kontrollen. Mätning och undersökning av den negativa kontrollen rekommenderas dock (se nedan: kvalitetskontroll).

Vid kvalitativ testutvärdering jämförs absorbansen hos proverna med gränsabsorbansen (=cut-off). Den fastställs enligt följande formel:

$$\text{absorbansgränsvärde} = \text{absorbanspositiv kontroll} \times \text{faktor}$$

Faktorn beror på kit-loten och anges i det lotspecifika analyscertifikatet som medföljer varje testkit. Exempel:

$$\begin{aligned} \text{absorbanspositiv kontroll} &= 1\,250 \text{ mOD} \\ \text{faktor} &= 0,35 \\ \text{absorbansgränsvärde} &= 1\,250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

För att få en uppskattning av hur positivt ett visst prov är för β2-GP-1-Ab (IgG), kan man beräkna kvoten, enligt följande formel:

$$\text{kvot} = \text{absorbansprov} / \text{absorbansgränsvärde}$$

Exempel:

$$\begin{aligned} \text{Absorbansgränsvärde} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbansprov} &= 1\,480 \text{ mOD} \\ \text{kvot} &= 1\,480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Kvalitetskontroll: Den positiva och negativa kontrollen kontrollerar analysens prestanda. Deras auktoriserade värden respektive godkända intervall anges i det lotspecifika analyscertifikatet. Kontrollernas värden måste falla inom de angivna intervallen, annars är analysresultaten ogiltiga.

10. Tolkning av resultat / metodens begränsningar

Med utgångspunkt från mätning av en blodgivare och ett urval positiva sera (se nedan), föreslår vi för analys av patientsera:

| | kvantitativ utvärdering U β 2-GP-1-Ab (IgG) per ml serum | kvalitativ utvärdering kvot |
|------------------------------|--|--------------------------------|
| normalt (negativt) intervall | < 10,0 | < 0,84 |
| cut-off | 12,0 | 1,00 |
| obestämbar intervall | 10,0 – 14,4 | 0,84 - 1,19 |
| positivt intervall | > 14,4 | > 1,19 |

Dessa specifikationer anges endast som en indikation. För att kontrollera exaktheten bör varje analys inkludera parallella prover av normala sera.

Ett negativt testresultat indikerar att patienten inte har en förhöjd nivå av IgG antikroppar mot β 2-GP-1. Om ändå karakteristiska kliniska tecken på APS observeras, IgA/IgM antikroppar riktade mot β 2-GP-1CL och/eller antikroppar riktade mot CL bör bestämmas.

Ett positivt resultat bör betraktas som en indikation på APS som beskrivs i början.

Prover som visar resultat mellan ovan angivna gränser bör anses vara obestämbara och rapporteras som sådana. Vi rekommenderar att ytterligare ett prov tages två veckor senare och körs parallellt med det första provet för att dokumentera eventuell förändring i antikroppstitern.

I likhet med alla serologiska analyser bör resultaten tolkas mot beaktande av patientens symtom och andra diagnostiska kriterier.

11. Prestanda

11.1. Standardisering

Testet är standardiserat med en renad serumberedning som innehåller IgG-antikroppar som är specifikt inriktade mot β 2-GP-1. Denna beredning har kalibrerats mot „DeBari“ standard serum(9). Graden av reaktivitet i provet mäts i relativa („DeBari) enheter (U β 2-GP-1-Ab (IgG)/ml).

11.2. Analytisk specificitet

Testet medger specifik bestämning av humana IgG-antikroppar, riktade mot β 2-GP-1.

11.3. Detektionsgräns (analytisk sensitivitet)

Detektionsgränsen definieras som den koncentration av analytet som motsvarar genomsnittlig absorbans av provbuffert plus 3-faldig standardavvikelse (s). Det fastställdes som $< 0,5$ U β 2-GP-1-Ab (IgG) per ml serum (n = 24).

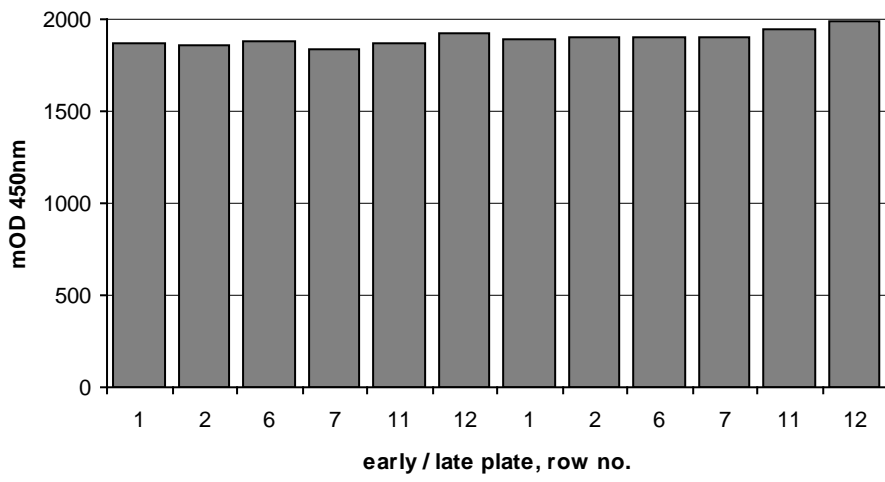
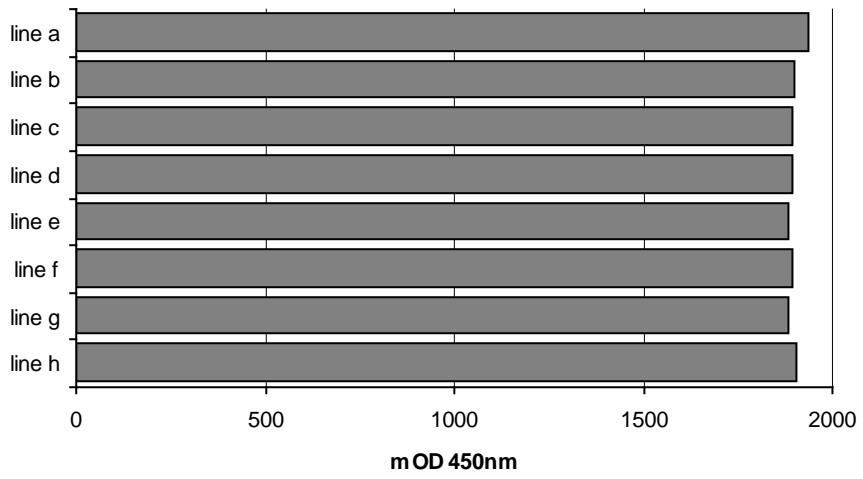
Rekommenderat mätintervall: 2 - 100 U β 2-GP-1-Ab (IgG) per ml serum

11.4. Homogenitet i fast fas

Mätning av homogenitet i fast fas är en normal del av kvalitetskontrollen av varje produktionslot. Det bestäms genom 288-faldig mätning av ett IgG-positivt prov som inte är saturerande på 3 valda plattor. Kriterium för godkännande: mOD-variationskoefficient (cv) över plattorna < 8 %.

Bilden nedan visar ett typiskt utdrag (fast fas lotnr.1002D) av en sådan analys.

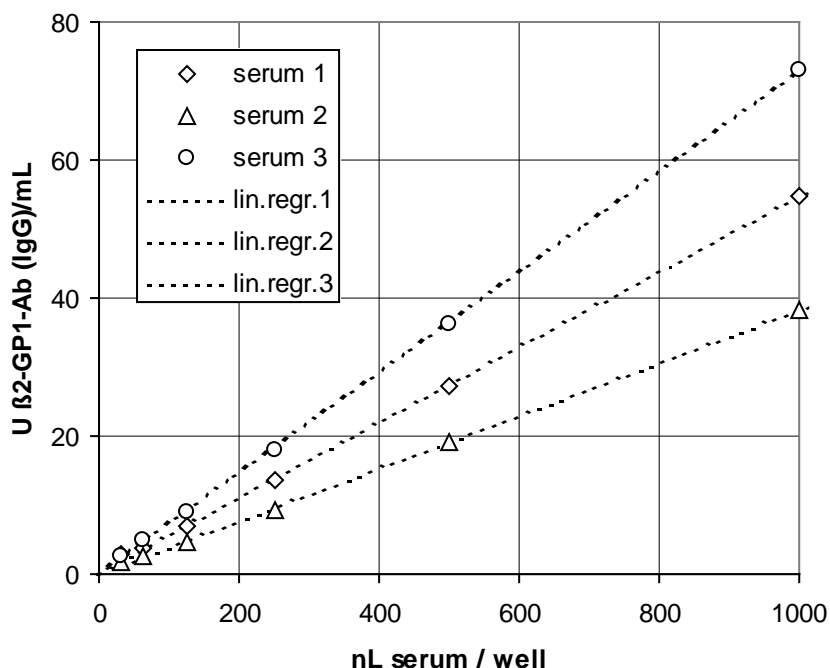
| plate | early (n/10) | | | | | | late (9n/10) | | | | | | mean cv% | |
|--------|--------------|------|------|------|------|------|--------------|------|------|------|------|------|-------------|-----|
| | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | 1 | 2 | 6 | 7 | 11 | 12 | | |
| line a | 1883 | 1862 | 1896 | 1887 | 1907 | 1958 | 1929 | 1941 | 1961 | 1929 | 2003 | 2054 | 1934 | 2,8 |
| line b | 1849 | 1826 | 1834 | 1833 | 1879 | 1919 | 1917 | 1915 | 1928 | 1909 | 1959 | 2018 | 1899 | 3,0 |
| line c | 1864 | 1841 | 1861 | 1825 | 1880 | 1918 | 1899 | 1881 | 1898 | 1918 | 1954 | 2019 | 1897 | 2,8 |
| line d | 1858 | 1825 | 1835 | 1816 | 1876 | 1935 | 1891 | 1916 | 1910 | 1912 | 1965 | 1991 | 1894 | 2,9 |
| line e | 1843 | 1816 | 1851 | 1814 | 1852 | 1929 | 1888 | 1900 | 1897 | 1909 | 1928 | 1973 | 1883 | 2,6 |
| line f | 1874 | 1901 | 1910 | 1860 | 1872 | 1908 | 1867 | 1892 | 1884 | 1900 | 1923 | 1952 | 1895 | 1,4 |
| line g | 1881 | 1913 | 1920 | 1827 | 1854 | 1896 | 1856 | 1877 | 1874 | 1880 | 1911 | 1930 | 1885 | 1,6 |
| line h | 1932 | 1918 | 1912 | 1822 | 1865 | 1959 | 1883 | 1926 | 1865 | 1878 | 1906 | 1989 | 1905 | 2,4 |
| mean | 1873 | 1863 | 1877 | 1836 | 1873 | 1928 | 1891 | 1906 | 1902 | 1904 | 1944 | 1991 | 1899 | |
| cv% | 1,5 | 2,3 | 1,9 | 1,4 | 0,9 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,6 | 0,9 | 1,7 | 2,0 | 2,5 | |



0911FE00.FED/FptHomV1410J

11.5. Linjäritet

För att bedöma testets dos-responsförhållande, mättes positiva sera i seriell 2-faldig spädning. Kriterium för godkännande: linjär regression av fyra spädningar efter varandra måste ge en korrelationsfaktor > 0,98. Ett typiskt resultat visas nedan.



0911FE00.FED/LinearV1410J

11.6. Precision

För att bedöma testets precision fastställdes resultatens variabilitet under följande förhållanden: a. inom 1 analys och mellan 3 analyser, b. mellan 3 operatörer och c. mellan 2 kit-loter.

a. Variabilitet inom analys och mellan analyser (n = 24 respektive 72)

| prov | medelvärde U/mL | variabilitet (cv %) inom analys | mellan analyser |
|------|--------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1 | 12 | 4,8 | 5,2 |
| 2 | 20 | 4,3 | 5,0 |
| 3 | 43 | 6,4 | 7,4 |

b. Variabilitet mellan operatörer (n = 12)

| prov | medelvärde U/mL | variabilitet (cv %) |
|------|--------------------|------------------------|
| 1 | 14 | 3,9 |
| 2 | 25 | 3,3 |
| 3 | 43 | 2,3 |

c. Variabilitet mellan 2 kit-loter (n = 6)

| prov | medelvärde U/mL | variabilitet (cv %) |
|------|--------------------|------------------------|
| 1 | 15 | 10,0 |
| 2 | 25 | 8,5 |
| 3 | 52 | 10,4 |

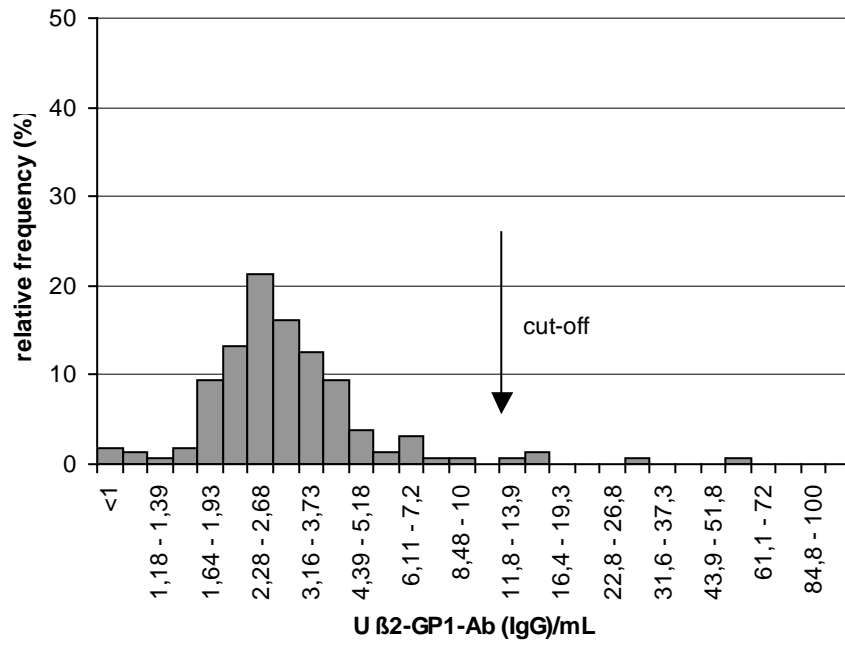
11.7. Frekvensdistribution av β 2-GP-1-Ab (IgG)

Detta analyserades i sera från blodgivare, jämnt fördelat mellan kön och ålder och från sera som befunnits positiva i CE-godkänt referens-ELISA. Följande fördelning av analyt observerades:

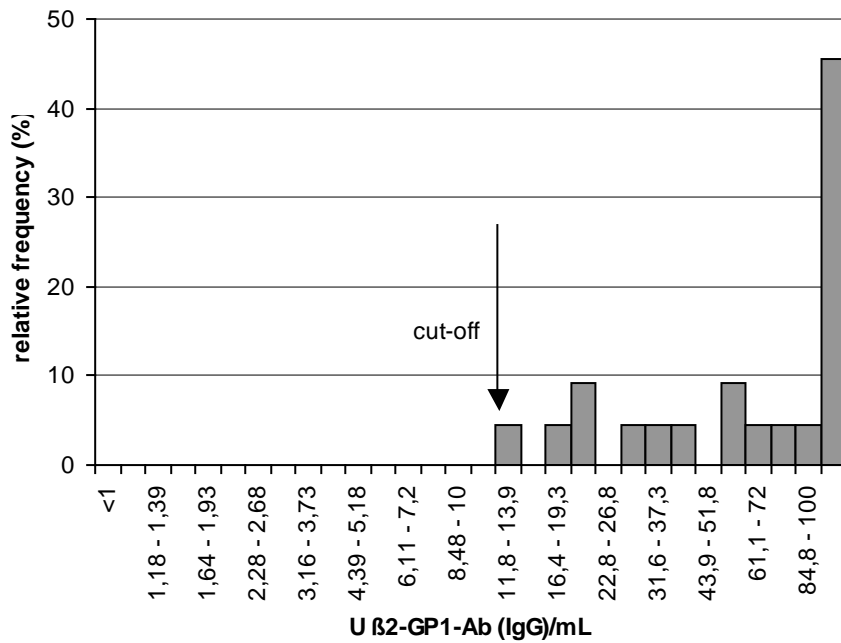
| | | | |
|-------------------|-----------|------------------|----------|
| blodgivarsera | | positiva sera | |
| n: | 160 | n: | 22 |
| medelvärde: | 3,7 U/ml | medelvärde: | 130 U/ml |
| medelvärde + s: | 8,6 U/ml | medelvärde - s: | < 0 U/ml |
| medelvärde + 2s: | 13,5 U/ml | medelvärde - 2s: | < 0 U/ml |
| median: | 2,7 U/ml | median: | 88 U/ml |
| 95:e percentilen: | 6,7 U/ml | 5:e percentilen: | 18 U/ml |

ROC-analys av dessa data användes för att bestämma gränsvärdet som 12,0 U β 2-GP-1-Ab (IgG)/mL(10). De data som visas här visar på en diagnostisk specificitet och sensitivitet hos denna ELISA på cirka 97 respektive nästan 100 %. Dessa värden gäller endast analyserade sera; andra provsamlingar kan ge andra resultat.

blood donor sera



positive sera

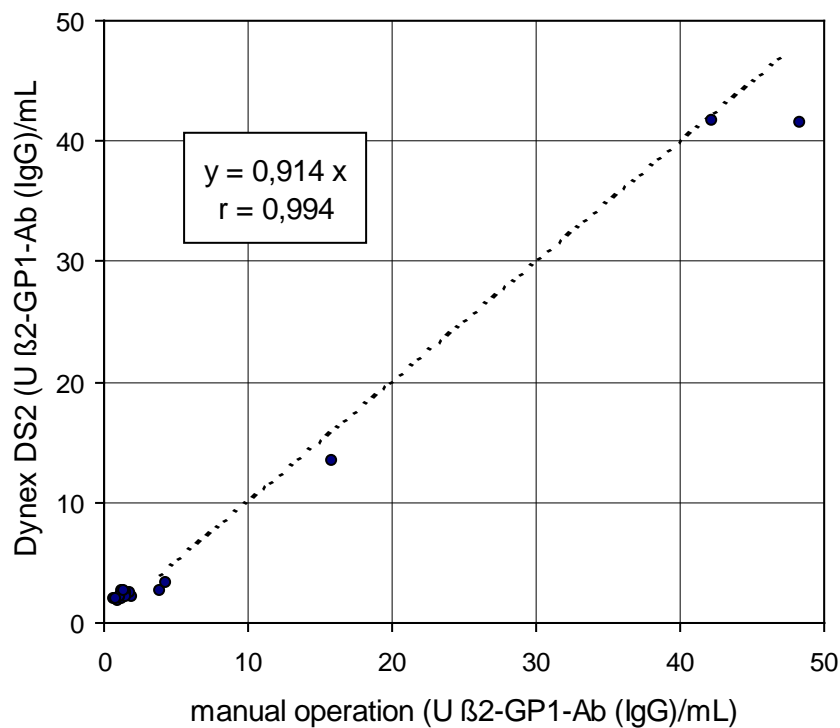


11.8. Manuell förfarande jämfört med Dynex DS2 automatiskt ELISA-system
 Variabilitet: Genom att använda prover från en och samma kit-lot, jämfördes analysresultatens variabilitet mellan manuell användning och Dynex DS2 automatiskt ELISA-system:

| | manuell användning | Dynex DS2 |
|--|-----------------------|-----------------------|
| variabilitet inom analys (n = 16) | medelvärde cv = 1,7 % | medelvärde cv = 1,7 % |
| variabilitet mellan analyser (n = 48) | medelvärde cv = 1,9 % | medelvärde cv = 2,6 % |

Standardkurva: visas i paragraf 9

Korrelation:



0911FE00.FED/KorrDynexDS2-V1410J

12. Garanti

Euro Diagnostica AB garanterar att levererad produkt har testats grundligt för att säkerställa att de egenskaper som specificeras här har uppfyllts. Inga ytterligare garantier lämnas.

De prestationsdata som presenteras här erhöles med användning av angiven metod. Eventuell modifikation av metoden kan påverka resultaten varvid Euro Diagnostica AB friskriver sig från alla garantier, såväl uttryckliga som underförstådda eller lagstiftade. Euro Diagnostica AB bär inte heller något ansvar för eventuella skador, vare sig direkta, indirekta eller efterföljande som uppstår till följd av felaktig användning eller förvaring av produkten.

13. Symboler



Katalognummer



Satsnummer



Innehåller tillräcklig mängd för $\langle n \rangle$ tester



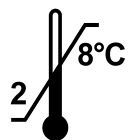
Medicinteknisk produkt för *in vitro*-diagnostik



Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter



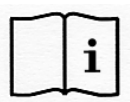
Skyddas från solljus



Temperaturgränser



Hållbar till



Läs instruktionsmanualen.



Biologiska risker



Tillverkare

14. Referenser

1. Gromnica-Ihle, E., and 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 β 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. 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
9. Erickson, E. N., et al.: Reference calibrators for IgG antibodies to β 2-GP-1: Preparation, properties, and availability to investigators. *Clin. Chem.* 42 (1996), 1116-1117
10. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

15. Sammanfattande flödesschema

- a. Späd sera i 1/100 i provbuffert (100 ml, klar att användas, orange) och blanda.
- b. Späd tvättbufferten (10x-koncentrat [100 ml, blå]) med vatten och blanda.
- c. Tvätta brunnarna en gång med 350 ul tvättbuffert vardera. Dispensera 100 ul av kalibratorerna (2,0 ml i varje, klara att användas, gradvis blå), kontrollerna (2,0 ml i varje, klara att användas, grön och röd) samt de utspädda proverna i den fasta fasens brunnar. Mätningar i duplikat rekommenderas. Inkubera i 30 minuter i rumstemperatur (23 ± 3 °C).
- d. Tvätta brunnarna 4 gånger med 350 ul tvättbuffert vardera.
- e. Dispensera 100 µl av konjugatet (14 ml, klart att använda, rött) i brunnarna. Inkubera som i steg c.
- f. Upprepa tvättmomentet i steg d.
- g. Dispensera 100 µl av substratlösningen (14 ml, klar att använda, svart flaska) per brunn. Inkubera som i steg c och tillsätt därefter 100 µl stopplösning (14 ml, klar att använda, färglös) per brunn och skaka plattan en kort stund.
- h. Mät omedelbart absorbansen vid 450 nm.
- i. Kvantitativ utvärdering: Bestäm standardkurvan och omvandla provernas absorbans, med användning av denna kurva, till deras respektive antikropps-koncentration (U/mL).
- j. Kvalitativ utvärdering: Bestäm gränsabsorbansen genom att multiplicera absorbansen i den positiva kontrollen med den faktor som anges i analyscertifikatet. Beräkna därefter provernas kvot genom att dela deras absorbans med gränsabsorbansen.



Euro Diagnostica AB, Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00 E-mail: info@eurodiagnostica.com

Fax: +46 40 43 22 88 Internet: www.eurodiagnostica.com

0711FE60.FWD / 31030