

Serazym[®] Anti-Cardiolipin- β 2- GP I IgG/IgM

Enzymimmunoassay zum Nachweis von IgG- und/oder IgM-Antikörpern gegen
Cardiolipin- β 2-Glykoprotein I-Komplex
in humanem Serum oder Plasma

REF E-054  96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Autoantikörper gegen Cardiolipin gelten als diagnostische Marker des Anti-Phospholipid-Syndroms (APS), einer Autoimmunerkrankung, die streng assoziiert ist mit wiederkehrenden Ereignissen venöser und arterieller Thrombosen, Spontanaborten und Thrombocytopenie (1,2,3). Anti-Cardiolipin-Antikörper sind bis zu 60% bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses, in mehr als 50% der Patienten mit Juveniler chronischer Arthritis und Vaskulitis, in 20-30% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis, in 18-46% junger Erwachsener mit Cerebraler Ischämie, in 25% der Patienten mit primärem Sjögren Syndrom und bei 21% junger Erwachsener mit Myocardinfarkt nachweisbar.

Die Bestimmung von anti-Cardiolipin-Antikörpern erfordert die Anwesenheit des Serumproteins β 2-Glykoprotein I (β 2-GP I, Apolipoprotein H) als Kofaktor. Durch Konformationsänderungen im β 2-GP I-Cardiolipin-Komplex werden Epitope exponiert, die von anti-Cardiolipin-Autoantikörpern erkannt werden (4). Antikörper gegen reines Cardiolipin werden dagegen oft im Serum von Patienten mit Infektionskrankheiten nachgewiesen. Autoantikörper gegen Cardiolipin können vom IgA-, IgM- oder IgG-Isotyp sein, wobei IgG-Antikörper den häufigsten und klinisch bedeutsamsten Isotyp repräsentieren. Beim APS können alle Isotypen während aller Krankheitsstadien nachweisbar sein, jedoch können die einzelnen Isotypen mit spezifischen Manifestationen assoziiert sein:

IgG: Venöse und/oder arterielle Thrombosen, wiederkehrende Spontanaborte, neurologische Symptome.

IgM: Venöse Thrombosen, Thrombocytopenie, wiederkehrende Spontanaborte, neurologische Symptome, Livedo reticularis, endocardiale Läsionen.

IgA: Vaskulitis, Sicca Symptome, Thrombocytopenie.

Literatur:

1. Conrad K, Schöbner W, Hiepe F „Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases “ A Diagnostic Reference, Vol. 2, 2002. Editors K. Conrad, U. Sack, Pabst Science Publishers Arthritis Rheum. 1999; 42:833-843.
2. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA “Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding factor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)” Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87:4120-4124.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young GG, Loizou S and Hughes GRV “Anti-cardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus” Lancet 1983 11:1211

Anwendungsbereich

Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM ist ein *in-vitro* Diagnostikum zum quantitativen Nachweis von IgG- und/oder IgM-Antikörpern gegen den Cardiolipin-β2-Glykoprotein I (β2-GP I)-Komplex in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Im ersten Inkubationsschritt reagieren die verdünnten Proben, die gebrauchsfertigen Kalibratoren, sowie die positive Kontrolle mit den an der festen Phase adsorbierten Cardiolipin-β2-GP I-Komplex. Ungebundene Komponenten werden nach einer 60 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT, 18...25°C) durch Absaugen und einem anschließenden Waschprozess entfernt.

Im zweiten Inkubationsschritt binden die Peroxidase (POD)-markierten anti-human-IgG oder -IgM Antikörper an die Probenantikörper. Ungebundenes Konjugat wird nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT durch Absaugen und einem anschließenden Waschprozess entfernt.

Im dritten Schritt setzt die Peroxidase in einem 15 minütigen Inkubationsschritt bei RT die zugesetzte farblose Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt um. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen, wodurch ein Farbumschlag von blau zu gelb stattfindet.

Die bei 450/≥620 nm gemessene Extinktion (OD) des Endprodukts ist der Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Anhand der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren und deren entsprechenden Antikörper-Konzentrationen wird eine Kalibratorkurve erstellt, an der die Konzentrationen der unbekanntenen Proben abgelesen werden können.

Testkomponenten

Für 96 Kavitäten

1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit Cardiolipin-β2-GP I-Komplex	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weisse Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	CAL 0 - 4	Kalibratoren 0-4 CAL 0 = 1 U/ml CAL 1 = 10 U/ml CAL 2 = 30 U/ml CAL 3 = 100 U/ml CAL 4 = 300 U/ml	1,0 ml pro Kalibrator gebrauchsfertig blau gefärbt weisse Kappe
5	CONTROL +	Positive Kontrolle Konzentration siehe Beipackzettel	1,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
6	CONJ HRP IgG	POD-Konjugat POD-markierte anti-human-IgG-Antikörper	15 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe
7	CONJ HRP IgM	POD-Konjugat POD-markierte anti-human-IgM-Antikörper	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt grüne Kappe
8	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
9	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe
10		Abdeckfolien	2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum oder das Plasma durch Zentrifugation isolieren. Es kann sowohl Serum als auch Plasma im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM verwendet werden. Kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Die Lagerung der Proben ist bis zu 2 Tage bei 2...8 °C möglich. Darüber hinaus sollten die Proben bei -20 °C eingefroren werden.

Vorbereitung vor Verwendung

Vor der Verwendung sollten die Proben auf RT erwärmt werden. Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine Homogenität gesichert werden.

Hinweis: Die Patientenproben müssen vor dem Einsatz im Test 1 : 101 extern verdünnt werden, z.B. 10 µl Probe + 1000 µl Verdünnungsmedium (3).

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette 0,100 – 1,000 ml und 0,010 – 0,100 ml · Verstellbare 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten 0,050 – 0,200 ml · Pipettenspitzen · Reagenzbehälter zur Dispensierung mit 8-Kanalpipette · Messzylinder und Bechergläser 10 ml und 100 ml · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Stoppuhr

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Serazym[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM enthält Reagenzien für 12 x 8 Bestimmungen.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2...8 °C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem Aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und fest verschließen.

Stelle eine ausreichende Menge an Waschlösung durch das Verdünnen des Waschpuffers (10-fach) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser her.

Beispiel: 10 ml Waschpuffer (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Testdurchführung

Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 101 (v/v) verdünnen,

z.B. 10 μ l Probe + 1000 μ l Verdünnungsmedium (3).

Die Kalibratoren und die Positive Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Einwirkzeit der Waschlösung in den Kavitäten muss mindestens 5 Sekunden pro Waschzyklus betragen. Die Flüssigkeit muss nach jedem Waschzyklus komplett entfernt werden. Es wird empfohlen Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten zu entfernen.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 100 µl **CAL 0** Kalibrator 0 (4) (optional)*
100 µl **CAL 1-4** Kalibrator 1, 2, 3, 4 (4)
100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Probe**
in die dafür vorgesehenen Kavitäten pipettieren.
3. Platte abdecken (10) und für 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 3x mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 100 µl **CONJ HRP IgG** POD-Konjugat (6) oder
100 µl **CONJ HRP IgM** POD-Konjugat (7) pro Kavität pipettieren.
6. Platte abdecken (10) und für 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 3x mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 100 µl **SUBSTR TMB** Substrat (8) pro Kavität pipettieren.
9. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 100 µl **STOP** Stopplösung (9) pro Kavität pipettieren, vorsichtig mischen.
11. Messen der OD bei 450 nm / \geq 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min nach Reaktionsstopp.

*Hinweis:

Das Mitführen von CAL 0 (1 U/ml) ermöglicht eine Quantifizierung der Konzentrationen unterhalb des CAL 1 Wertes (10 U/ml). Sollte keine Quantifizierung unterhalb des CAL 1 Wertes erforderlich sein, kann CAL 0 weggelassen werden.

Berechnung der Ergebnisse

Es wird eine Kalibratorkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren CAL 0-4 (y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (x-Achse) konstruiert. Alternativ kann eine Kalibratorkurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren CAL 1-4 (y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (x-Achse) konstruiert werden.

Zur Erstellung der Kalibratorkurve wird das 4-Parameter-Regressionsmodell empfohlen.

Die Extinktionen der verdünnten Proben werden in Antikörperkonzentrationen U/ml (Antikörper-Einheiten/ml) durch Ablesen an der Kalibratorkurve umgewandelt. Die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren berücksichtigen bereits den regulären Verdünnungsfaktor der Serumproben von 1 : 101.

Bei Proben, deren Extinktion diejenige des Kalibrators CAL 4 überschreitet, ist die Bestimmung mit einer höheren externen Vorverdünnung zu wiederholen und das Ergebnis mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung zu multiplizieren:

Probenvolumen	zugewetztes Volumen (Verdünnungsmedium)	Finale Volumen	Verdünnung der Original-Probe	Multiplikationsfaktor
10µl	1000µl	1010µl	1 : 101 = <i>Probe 1</i>	<i>Keine Multiplikation notwendig</i>
500µl <i>Probe 1</i>	500µl	1000µl	1 : 202 = <i>Probe 2</i>	Faktor 2
500µl <i>Probe 2</i>	500µl	1000µl	1 : 404 = <i>Probe 3</i>	Faktor 4
500µl <i>Probe 3</i>	500µl	1000µl	1 : 808 = <i>Probe 4</i>	Faktor 8

Es ist zu beachten, dass Antikörper in Verdünnungen evtl. nicht stabil sind, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Aus diesem Grund sollte eine notwendige Nachuntersuchung in einer höheren Verdünnung am selben Tag durchgeführt werden.

Referenzwerte

Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM	
Positiv	≥ 10 U/ml
Negativ	< 10 U/ml

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden wenn:

- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 0 < CAL 1
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 1 ≤ 0,70
- Der Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 4 ≥ 1,20

Sind die o.g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten- und Temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

Jede klinische Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer *in-vitro* diagnostischen Methode basieren. Um eine Diagnose zu erstellen sollten Ärzte sowohl alle klinischen Ergebnisse als auch die Laborergebnisse berücksichtigen. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Inkubation der Proben und der Kalibratoren können zu falschen Ergebnissen führen.

Bei automatischer Abarbeitung auf ELISA Prozessoren kann es in Abhängigkeit von der Einstellung des Washers gegebenenfalls empfehlenswert sein, die Kavitäten 5 mal (anstelle von 3 mal) je Waschzyklus zu waschen.

Gesunde Individuen sollten mit dem *Serazym®* Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM Testbesteck negativ bestimmt werden, wobei die Prävalenz bei Gesunden 3-5% beträgt.

Da Anti-Cardiolipin-Antikörper auch bei Infektionserkrankungen auftreten können, sollte der Nachweis bei einem positiven Befund nach 6-8 Wochen zur Bestätigung eines APS wiederholt werden. Die bei Infektionserkrankungen auftretenden anti-Cardiolipin-Antikörper benötigen zu ihrer Bindung an das Cardiolipin meist nicht das β2-GP I. Außerdem sind sie nicht mit den klinischen Symptomen des APS assoziiert. Eine Interpretation des Ergebnisses sollte nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen.

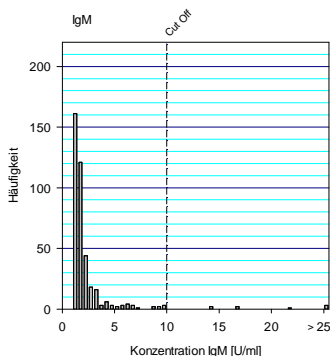
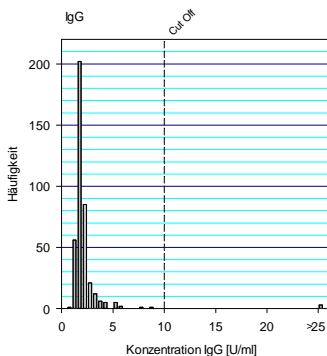
Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG, können aber die Ergebnisse im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgM beeinflussen.

Leistungsmerkmale

Häufigkeitsverteilung

Die Häufigkeitsverteilung der Antikörperkonzentration im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM von 400 humanen Blutspenderseren ist hier dargestellt:



Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK [%]) im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

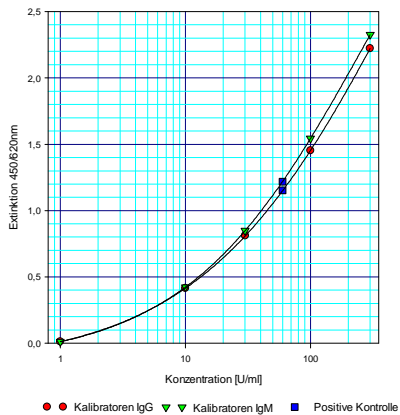
Probe	IgG		IgM	
	Konzentration [U/ml]	VK [%]	Konzentration [U/ml]	VK [%]
Serum 1	26,9	2,3	27,4	4,1
Serum 2	60,7	8,9	51,2	8,8
Serum 3	143,4	6,0	109,0	4,0
Serum 4	200,7	9,1	264,7	8,8

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK %) im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM in 8 unterschiedlichen Ansätzen aus 3-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	IgG		IgM	
	Konzentration [U/ml]	VK [%]	Konzentration [U/ml]	VK [%]
Serum A	42,7	10,3	30,8	7,4
Serum B	81,2	8,2	78,8	9,5
Serum C	129,4	10,4	136,7	10,1
Serum D	215,0	6,2	184,4	13,9

Typische Referenzkurve

Eine typische Referenzkurve im *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM ist hier dargestellt:



Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck, seine geöffneten Reagenzien sowie die verdünnten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen mit Ausnahme von Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung ist nicht erlaubt. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Zeitverzögerungen beim Pipettieren sind zu vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) und Thimerosal (< 0,01 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Inkubationsschema *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM

- | | | | |
|----|---|-------------|--|
| 1. |  | 100 μ l | CAL 0 – 4 (4) |
| | | 100 μ l | CONTROL + (5) |
| | | 100 μ l | verdünnte Probe |
| |  | 60 min | Inkubation (Raumtemperatur) |
| | | 3 x waschen | mit Waschlösung |
| 2. |  | 100 μ l | CONJ HRP IgG (6) oder CONJ HRP IgM (7) |
| | | 30 min | Inkubation (Raumtemperatur) |
| |  | 3 x waschen | mit Waschlösung |
| 3. |  | 100 μ l | SUBSTR TMB (8) |
| | | 15 min | Inkubation bei RT, lichtgeschützt |
| 4. |  | 100 μ l | STOP (9) |

Messung der Extinktion bei 450 / \geq 620 nm



Hersteller

REF

Bestell-Nummer

LOT

Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum






Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Serazym[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM

Enzyme immunoassay for detection of IgG and/or IgM antibodies to
cardiolipin- β 2-glycoprotein I -complex
in human serum or plasma

REF E-054  96  *In-vitro*-diagnostic device 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Autoantibodies to cardiolipin are diagnostic markers for the antiphospholipid syndrome (APS), an autoimmune disease strongly associated with recurrent episodes of venous and arterial thrombosis, spontaneous abortion and thrombocytopenia. Anti-Cardiolipin antibodies are detectable in up to 60 % of patients with Systemic Lupus Erythematosus, in more than 50 % of patients with Juvenile Chronic Arthritis and Vasculitis, in 20-30 % of patients suffering from Rheumatoid Arthritis, in 18-46 % of Cerebral Ischemia in young adults, in 25 % of patients with Primary Sjögren's syndrome and in 21 % of young adults with Myocardial Infarction.

The determination of autoantibodies to cardiolipin requires the presence of the serum protein β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) as cofactor. The cardiolipin- β 2-glycoprotein I-complex is characterized by conformational changes thus building epitopes recognized by anti-cardiolipin autoantibodies. Antibodies to cardiolipin in the absence of β 2-glycoprotein-1 are often detected in patients with infectious diseases. Autoantibodies to cardiolipin can be of the IgG, IgM or IgA isotype with IgG being the most prevalent and clinically significant isotype.

In APS all cardiolipin isotypes may be detectable at all stages of the disease, but the individual isotypes are associated with specific manifestations:

IgG: Venous and/or arterial thrombosis, recurrent spontaneous abortion, neurological symptoms.

IgM: Venous thrombosis, thrombocytopenia, recurrent spontaneous abortion, neurological symptoms, livedo reticularis, endocardial lesions.

IgA: Vasculitis, sicca symptoms, thrombocytopenia.

References:

1. Conrad K, Schöbeler W, Hiepe F „Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases “ A Diagnostic Reference, Vol. 2, 2002. Editors K. Conrad, U. Sack, Pabst Science Publishers Arthritis Rheum. 1999; 42:833-843.
2. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA “Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding factor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)” Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87:4120-4124.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young GG, Loizou S and Hughes GRV “Anti-cardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus” Lancet 1983 11:1211

Intended Use

Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM is an *in-vitro* diagnostic device for quantitative determination of IgG and/or IgM antibodies to cardiolipin- β 2-glycoprotein I (β 2-GP I)-complex in human serum or plasma.

Principle of the test

In the first incubation step diluted samples, ready-to-use calibrators and positive control react with the solid-phase adsorbed cardiolipin- β 2-GP I-complex. Unbound components are removed after 60 minutes incubation at room temperature (RT, 18...25 °C) by aspirating the samples followed by a washing step.

In the second incubation step horseradish peroxidase (HRP)-labelled anti-human-IgG or -IgM antibodies bind to sample antibodies. Unbound conjugate is removed after 30 minutes incubation at RT by aspiration followed by a washing step.

In the third step the HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) within a 15 min reaction time at RT into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow.

The absorbance of the solution read at 450/ \geq 620 nm (OD) is directly proportional to the amount of specifically bound antibodies. A calibration curve is established by plotting the concentrations of the antibodies of the calibrators (x-axis) and their corresponding absorbance values (y-axis). The antibody concentrations of the unknown specimens are directly read from the calibration curve.

Test components

		For 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with cardiolipin-β2-GP I-complex
		12 single breakable 8-well strips vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold
		100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent
		100 ml · ready-to-use coloured red black cap
4	CAL 0 - 4	Calibrators 0-4 CAL 0 = 1 U/ml CAL 1 = 10 U/ml CAL 2 = 30 U/ml CAL 3 = 100 U/ml CAL 4 = 300 U/ml
		1.0 ml per calibrator ready-to-use coloured blue white cap
5	CONTROL +	Positive control Concentration see leaflet enclosed
		1.0 ml · ready-to-use coloured blue red cap
6	CONJ HRP IgG	HRP-conjugate HRP-labelled, anti-human-IgG antibodies
		15 ml · ready-to-use coloured red red cap
7	CONJ HRP IgM	HRP-conjugate HRP-labelled, anti-human-IgM antibodies
		15 ml · ready-to-use coloured green green cap
8	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide
		15 ml · ready-to-use blue cap
9	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid
		15 ml · ready-to-use yellow cap
10		Adhesive film
		2

Preparation and storage of samples

Collection and storage

Blood is taken by venipuncture. Serum or plasma is separated after clotting by centrifugation. Serum or plasma can be used in the *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM. Contaminated samples should not be used. Repeated freezing and thawing should be avoided. The samples may be kept at 2...8 °C for up to two days. Long-term storage requires -20 °C.

Preparation before use

Allow samples to reach RT prior to assay. Take care to agitate samples gently in order to ensure homogeneity.

Note: Patient samples have to be diluted 1 : 101, e.g. 10 µl sample + 1000 µl sample diluent (3).

Materials required but not provided

Adjustable one-channel micropipette 0.100 - 1.000 ml and 0.010 - 0.100 ml · Adjustable 8-channel micropipette 0.050 - 0.200 ml · Pipette tips · Reagent containers for dispensing with 8-channel pipette · Graduated measuring flasks 10 ml and 100 ml · Test tubes 2.0 ml for sample dilution · Microtitration plate washer (automatic or hand wash head) · Microtitration plate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · Distilled or deionized water · Stop-watch

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

The *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM has been designed for 12 x 8 determinations. The complete kit with unopened reagent bottles and microtitration strips is stable until the expiry date printed on the kit box in case of storage at 2...8 °C. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8 °C.

Reagent preparation

The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For example: 10 ml wash buffer (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Besides wash buffer all components of the device are ready-to-use.

Assay procedure

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay.

Dilute patient samples with sample diluent (3) 1 : 101 (v/v), e.g. 10 μ l sample + 1000 μ l sample diluent (3).

The calibrators and the positive control are ready-to-use.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CAL 0** Calibrator 0 (4) if desired*
 100 µl **CAL 1 – 4** Calibrator 1, 2, 3, 4 (4)
 100 µl **CONTROL +** positive control (5)
 100 µl **diluted samples** resp.
 into the intended wells.
3. Cover plate (10) and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 3x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
5. Dispense 100 µl **CONJ HRP IgG** HRP-conjugate (6) **or**
 100 µl **CONJ HRP IgM** HRP-conjugate (7) per well
6. Cover plate (10) and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 3x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
8. Dispense 100 µl **SUBSTR TMB** substrate (8) per well.
9. Incubate for 15 min at RT, protected from light.
10. Dispense 100 µl **STOP** stop solution (9) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

* Note:

Using CAL 0 (1 U/ml) enables quantification of concentrations below the value of CAL (10 U/ml), otherwise CAL 0 is not needed.

Result interpretation

Create a calibration curve by plotting the mean absorbances of the calibrators CAL 0-4 (Y-axis) to their corresponding antibody-concentrations (X-axis).
 Alternatively create a calibration curve by plotting the mean absorbances of the calibrators CAL 1-4 (Y-axis) to their corresponding antibody-concentrations (X-axis).

For the calibration curve use the 4-Parameter-regression-model.

Determine the antibody-concentrations of the unknown samples by referring their mean absorbances to the calibration curve. In case of using the prescribed sample dilution of 1 : 101, antibody-concentrations are not to be determined by multiplication with the dilution factor, since the calibrators are already prediluted.

If a sample after proper dilution of 1:101 produced a higher absorbance than calibrator CAL 4 please retest the sample at higher dilution and calculate its concentration in the following way:

Sample volume	Added volume of diluent	Final volume	Dilution of original sample	Multiplication factor to determine analyte concentration of the original sample
<i>10µl</i>	<i>1000µl</i>	<i>1010µl</i>	<i>1 : 101 = Sample 1</i>	<i>No multiplication required</i>
500µl Sample 1	500µl	1000µl	1 : 202 = Sample 2	factor 2
500µl Sample 2	500µl	1000µl	1 : 404 = Sample 3	factor 4
500µl Sample 3	500µl	1000µl	1 : 808 = Sample 4	factor 8

Please be aware that antibodies may not be stable in diluted samples resulting in activity loss. By that reason reinvestigation at higher dilution should be done at the same day.

Reference values

Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM	
positive	≥ 10 U/ml
negative	< 10 U/ml

Test validity

A test run is valid if:

- the mean absorbance of calibrator CAL0 is < CAL 1
- the mean absorbance of calibrator CAL1 is ≤ 0.70
- the mean absorbance of calibrator CAL4 is ≥ 1.20

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation volumes, times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

Any clinical diagnosis should not be based on the results of *in-vitro* diagnostic methods alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis. False results may be caused by cross contaminations of the kit reagents and samples, bacterial or fungal contaminations of reagents and/or samples, incorrect washing and incorrect incubation times. In case of background problems when using automatic microplate ELISA systems it may be recommendable to wash wells 5 times (instead of 3 times) in every wash cycle.

Sera of healthy individuals should be tested negative in the Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM, but 3-5 % of healthy individuals exhibit anti-cardiolipin antibody-concentrations exceeding the cut-off value. Since anti-cardiolipin antibodies may also occur in infectious diseases, the test should be repeated after at least 6 weeks to ensure the diagnosis of APS. Anti-cardiolipin antibodies associated with infectious diseases do not require β2-GP I to recognize cardiolipin and they are not associated with the symptoms of APS.

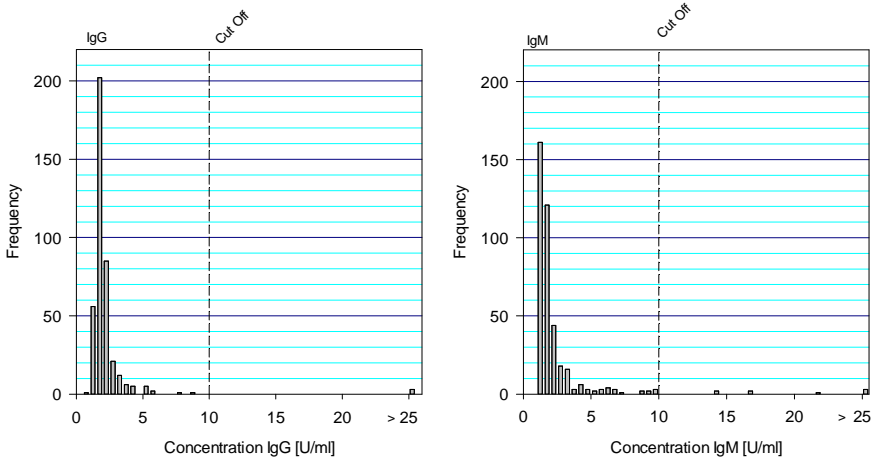
Interference

Haemolytic, lipaemic and icteric samples did not interfere with the determination of IgG and IgM anti-cardiolipin-β2-I-antibodies up to a concentration of 500mg/dl (haemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere with the determination of IgG anti- cardiolipin-β2-I-antibodies up to a concentration of 500 IU/ml, but can interfere with the determination of IgM anti- cardiolipin-β2-I-antibodies.

Performance characteristics

Frequency distribution

Frequency distribution of anti-Cardiolipin- β 2-GP I antibody concentrations in 400 blood donor serum samples measured in *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM:



Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM from 8-fold determinations of samples:

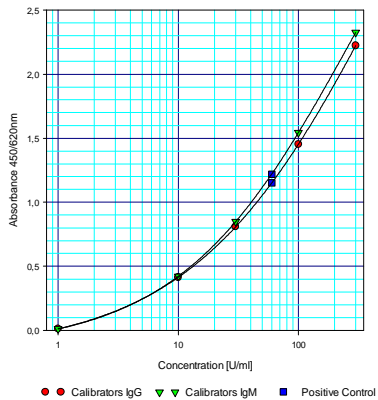
sample	IgG		IgM	
	concentration [U/ml]	CV [%]	Concentration [U/ml]	CV [%]
serum 1	26.9	2.3	27.4	4.1
serum 2	60.7	8.9	51.2	8.8
serum 3	143.4	6.0	109.0	4.0
serum 4	200.7	9.1	264.7	8.8

Inter-assay coefficient of variation (CV [%]) in the *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM from 8 different test runs with 3-fold determinations of samples:

sample	IgG		IgM	
	concentration [U/ml]	CV [%]	concentration [U/ml]	CV [%]
serum A	42.7	10.3	30.8	7.4
serum B	81.2	8.2	78.8	9.5
serum C	129.4	10.4	136.7	10.1
serum D	215.0	6.2	184.4	13.9

Typical reference curve

The typical reference curve in the *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM is illustrated:



Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for diluted reagents. Do not use or mix reagents from different lots, damaged packages or bottles or reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8 °C before use.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, substrate and stop solution.

Some of the reagents contain small amounts of Thimerosal (< 0.01 % w/v) and Kathon (1.0 % v/v) as preservative. They may neither be swallowed nor come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact rinse with plenty of water. Handle all samples as potentially infectious. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions must always be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!







Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!

Note safety precautions of the single test components!



Incubation scheme *Serazym*[®] Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM

- | | | | |
|----|---|-------------|--|
| 1. |  | 100 μ l | CAL 0 – 4 (4) |
| | | 100 μ l | CONTROL + (5) |
| | | 100 μ l | diluted samples resp. |
| |  | 60 min | incubation (room temperature) |
| | | 3 x wash | with wash solution |
| 2. |  | 100 μ l | CONJ HRP IgG (6) or CONJ HRP IgM (7) |
| | | 30 min | incubation (room temperature) |
| | | 3 x wash | with wash solution |
| |  | | |
| 3. |  | 100 μ l | SUBSTR TMB (8) |
| | | 15 min | incubation at RT protected from light |
| 4. |  | 100 μ l | STOP (9) |

Read absorbances at 450 / \geq 620 nm



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use

