











Serazym[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM

Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von IgG- oder IgM-Autoantikörpern gegen den Cardiolipin-β2-Gykoprotein I-Komplex in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

REF E-054 Σ 96
IVD In-vitro-Diagnostikum **CE**

 **Seramun Diagnostica GmbH** • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

UDI Eindeutige Produktidentifizierung	IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	LOT Chargennummer
Σ Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM ist ein IVD-Test zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern des IgG- oder IgM-Isotyps gegen den Cardiolipin- β 2-Glykoprotein I-Komplex in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung. Er dient der Diagnosehilfe des Antiphospholipid-Syndroms (APS) in Proben von Patienten mit Verdacht auf das Antiphospholipid-Syndrom.

Der Test darf nicht angewendet werden mit anderen Probenmaterialien als Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs, zu Diagnose, Überwachung, Screening, Vorhersage, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennahe Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM ist ein Enzymimmunoassay, bei dem die verdünnten Serum- oder Plasmaproben, die gebrauchsfertigen Kalibratoren sowie die Positivkontrolle mit dem an der festen Phase adsorbierten Cardiolipin- β 2-GP I-Komplex reagieren. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C) werden die ungebundenen Komponenten in einem Waschschrift entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt binden die Peroxidase (HRP)-markierten anti-human-IgG oder -IgM Antikörper an die Probenantikörper. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wird ungebundenes Konjugat in einem Waschschrift entfernt. Die HRP setzt im folgenden 15-minütigen enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Reaktionsprodukt um. Diese Reaktion wird nach Inkubation durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Anhand der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren und deren entsprechenden Antikörperkonzentrationen wird eine Kalibrierkurve erstellt, an der die Antikörperkonzentrationen der Patientenproben abgelesen werden können.

Testkomponenten (Lieferumfang)

Für 96 Kavitäten

1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit Cardiolipin- β 2-GP I-Komplex	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, farblos, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer K TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent L TRIS-basierter Puffer	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 je Kalibrator, gebrauchsfertig, blau gefärbt, weiße Kappe
5	CONTROL +	Positivkontrolle Konzentration siehe Analysezertifikat	1 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe
6	CONJ HRP IgG	HRP-Konjugat HRP-markierte anti-human-IgG Antikörper (Schaf)	15 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt, rote Kappe
7	CONJ HRP IgM	HRP-Konjugat HRP-markierte anti-human-IgM Antikörper	15 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, grüne Kappe

8	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® slow2 70 < 0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethyl- benzidin	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe
9	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
10	COVER	Abdeckfolie	2 Stück
11		Analysenzertifikat	1 Stück
12		Gebrauchsanleitung	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Waschpuffer (10x), Substrat und Stopplösung erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen.

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

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen.

Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
DIL	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CAL 0 - 4	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONTROL +	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
CONJ HRP IgG	Gefahrbestimmende Komponente H360D P202	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P501	Inhalt/Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
		Nur für gewerbliche Anwender. Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP IgM	Gefahrbestimmende Komponenten H360D P202	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
	P501	Inhalt/Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
		Nur für gewerbliche Anwender. Enthält Material tierischen Ursprungs.
SUBSTR	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich
STOP	Gefahrbestimmende Komponenten	Schwefelsäure 2,5 %
	H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Grenzen der Methode

Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu inkorrekten Ergebnissen führen. Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenzien sowie inkorrekte Zeiten bei der Inkubation der Proben und der Kalibratoren können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Gesunde Individuen sollten mit dem Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-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 für die Bindung an Cardiolipin zumeist nicht das β 2-GP I und sind nicht mit den klinischen Symptomen des APS assoziiert.

Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Behandlung der Proben

Probennahme

Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs in geeignetem Gefäß sammeln.

Probenhaltbarkeit und -lagerung

Serum- oder Plasmaproben humanen Ursprungs bis zu 2 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Vor der Verwendung die Proben auf Raumtemperatur erwärmen und durch kurzes Aufschütteln die Homogenität sichern

Patientenproben mit Probenpuffer 1 : 101 (v/v) in einem Teströhrchen (zusätzlich benötigtes Hilfsmittel) verdünnen.

Beispiel: 10 μ L Probe + 1000 μ L Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten 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 verschließen.

Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Außer dem Waschpuffer sind alle enthaltenen Komponenten gebrauchsfertig.

Das Substrat ist vor direktem Lichteinfall zu schützen. Sollte das Substrat dunkel gefärbt sein oder Partikel aufweisen, darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µL Kalibrator 0 optional*
 100 µL Kalibratoren 1, 2, 3 und 4
 100 µL Positivkontrolle
 100 µL verdünnte Probe pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 100 µL HRP-Konjugat pro Kavität oder
 100 µL HRP-Konjugat pro Kavität.
6. Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 3-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 100 µL Substrat pro Kavität.
9. 15 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
10. 100 µL Stopplösung pro Kavität, kurz schütteln.
11. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

* 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.

Auswertung der Ergebnisse

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

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

Die Extinktionen der verdünnten Proben werden in Antikörperkonzentrationen U/mL durch Ablesen an der Kalibrierkurve 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 Vorverdünnung zu wiederholen und das Ergebnis mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung zu multiplizieren:

Probenvolumen	Zugesetztes Volumen (Probenpuffer)	Finales Volumen	Verdünnung der Originalprobe	Multiplikationsfaktor
10 µL	1000 µL	1010 µL	1 : 101 = Probe 1	-
500 µL Probe 1	500 µL	1000 µL	1 : 202 = Probe 2	2
500 µL Probe 2	500 µL	1000 µL	1 : 404 = Probe 3	4

Es ist zu beachten, dass Antikörper in Verdünnungen eventuell 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.

Interpretation der Ergebnisse

Positiv	≥ 10 U/mL
Negativ	< 10 U/mL

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

- Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 0 $<$ CAL 1
- Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 1 $\leq 0,70$
- Extinktionsmittelwert von Kalibrator CAL 4 $\geq 1,20$

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Leistungsmerkmale

Sensitivität und Spezifität

IgG Isotyp

Sensitivität und Spezifität des Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM wurden im Rahmen einer retrospektiven Studie anhand von 196 Proben im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt. Diskrepante Proben wurden in einem weiteren kommerziellen ELISA getestet.

n = 196	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	62	11*
Serazym® ELISA negativ	0	123

Sensitivität: 100,0 %

Spezifität: 91,8 %

Die mit * gekennzeichneten Proben wurden in einem weiteren kommerziell erhältlichen ELISA nachuntersucht. Daraus ergibt sich eine korrigierte Spezifität von 93,9 %.

IgM Isotyp

Sensitivität und Spezifität des Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM wurden im Rahmen einer retrospektiven Studie anhand von 183 Proben im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt. Diskrepante Proben wurden in einem weiteren kommerziellen ELISA getestet.

n = 183	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	43	9*
Serazym® ELISA negativ	2**	129

Sensitivität: 95,6 %

Spezifität: 93,5 %

Die mit * und ** gekennzeichneten Proben wurden in einem weiteren kommerziell erhältlichen ELISA nachuntersucht. Daraus ergibt sich eine korrigierte Sensitivität von 97,9 % und eine korrigierte Spezifität von 95,6 %.

Präzision

Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden die 4 Proben in einer 8-fachen Bestimmung in einem Testlauf vermessen:

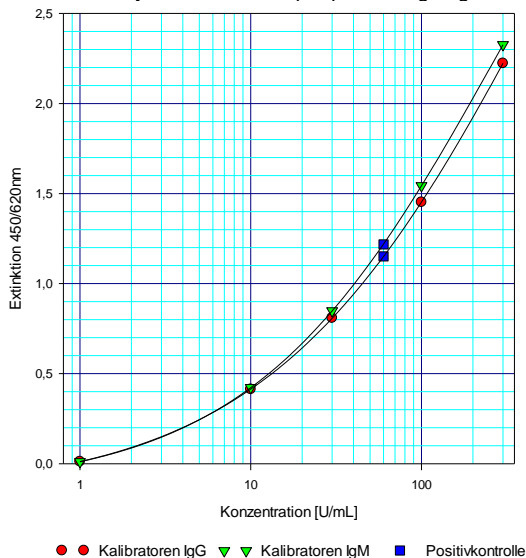
Probe	IgG		IgM	
	Konzentration [U/mL]	VK [%]	Konzentration [U/mL]	VK [%]
1	26,9	2,3	27,4	4,1
2	60,7	8,9	51,2	8,8
3	143,4	6,0	109,0	4,0
4	200,7	9,1	264,7	8,8

Die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) erfolgte durch eine Dreifachbestimmung von 4 Proben in 8 verschiedenen Testläufen:

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

Kalibrierkurve

Eine typische Kalibrierkurve im Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM ist nachfolgend dargestellt:



Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dL (Hämoglobin), 1000 mg/dL (Lipide) und 20 mg/dL (Bilirubin C und Bilirubin F) interferieren nicht. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/mL interferieren ebenfalls nicht im Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG, können aber die Ergebnisse im Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgM beeinflussen.

Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-11_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen von Sicherheitshinweisen Aktualisierung Wichtige Hinweise Aktualisierung der Leistungsmerkmale (Sensitivität und Spezifität)

Serazym[®] Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM

Enzyme immunoassay for the quantitative detection of IgG or IgM autoantibodies against cardiolipin-β2-glycoprotein I complex in serum or plasma of human origin

REF	E-054		96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device	CE	

Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
 T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

IVD In-vitro diagnostic medical device	UDI Unique device identifier	Manufacturer
Country of manufacture and date of manufacture	REF Article number	SN Serial number
Keep away from sunlight	Humidity limitation	LOT Batch code
Consult instructions for use	Temperature limit	Do not reuse
Sufficient for <i>n</i> tests	Biohazard	Use-by date
		Attention

Intended Use

Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM is an IVD test for the quantitative determination of autoantibodies of the IgG or IgM isotype against the cardiolipin-β2-glycoprotein I complex in serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin by a laboratory professional user.

It is intended to aid in the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) in samples from patients with suspicion of antiphospholipid syndrome.

The test must not be used with specimen materials other than serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin, for diagnosis, monitoring, screening, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near-patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM is an enzyme immunoassay in which the diluted serum or plasma samples, the ready-to-use calibrators and the positive control react with the cardiolipin-β2-GP I complex adsorbed to the solid phase. After a 60-minute incubation at room temperature (RT, 18...25 °C) unbound components are removed by a wash step. In the second incubation step horseradish peroxidase (HRP) labeled anti-human IgG or IgM antibodies bind to the sample antibodies. After a 30-minute incubation at RT unbound conjugate is removed in a wash step. HRP converts the colorless substrate solution to a blue reaction product in the following 15-minute enzymatic reaction step. The reaction is stopped by addition of the stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter, respectively, is directly proportional to the concentration of specifically bound antibodies. Using the measured absorbances of the calibrators and their corresponding antibody concentrations, a calibration curve is generated from which the concentrations of the patient samples can be read.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with cardiolipin-β2-GP I complex	12 single breakable 8-well strips, colorless, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer K TRIS based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL solution, colorless, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent L TRIS based buffer	100 mL, ready to use, colored 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 colored blue white cap
5	CONTROL +	Positive control Concentration see Certificate of Analysis	1.0 mL, ready to use, colored blue, red cap
6	CONJ HRP IgG	HRP conjugate HRP labeled, anti-human IgG antibody (sheep)	15 mL, ready to use, colored red, red cap
7	CONJ HRP IgM	HRP conjugate HRP labeled, anti-human IgM antibody (sheep)	15 mL, ready to use, colored green, green cap

8	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® slow70 < 0.1 % 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	15 mL, ready to use, colorless, blue cap
9	STOP	Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid	15 mL, ready to use, colorless, yellow cap
10	COVER	Covering film	2 pieces
11		Certificate of Analysis	1 piece
12		Instructions for Use	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micropipette • 8-channel pipette or multi-pipette with pipette tips • reagent container for multi-channel micro-pipettes • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer • microplate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by health professionals only.

Do not use reagents from damaged packages or bottles. The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash buffer (10x), substrate and stop solution.

All serious incidents occurring in relation with Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use. For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol. The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the cavities! Protect substrate from light!

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request.
DIL	-	Contains material of animal origin.
CAL 0 - 4	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request.
CONTROL +	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request.
CONJ HRP IgG	Hazard components H360D P202 P280 P308+P313 P501 EUH208	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone May damage the unborn child. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local regulations. Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users. Contains material of animal origin.
CONJ HRP IgM	Hazard components H360D P202 P280 P308+P313 P501 EUH208	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone May damage the unborn child. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local regulations. Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users. Contains material of animal origin.
SUBSTR	EUH210	Safety data sheet available on request.
STOP	Hazard components H290	Sulphuric acid 2.5 % May be corrosive to metals.

Limitations of the Procedure

Contamination of reagents and samples by bacteria or fungi as well as cross-contamination of the test kit reagents and samples can lead to incorrect results. Incorrect washing to separate unbound components from the sample and test reagents as well as incorrect incubation times of the samples and calibrators can cause incorrect results as well.

Healthy individuals should be determined negative with Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM, with a prevalence for anti-cardiolipin autoantibodies of 3 - 5% in healthy individuals. Since anti-cardiolipin autoantibodies can also emerge in infectious diseases, positive tests should be repeated after 6 - 8 weeks to confirm APS. The anti-cardiolipin antibodies that emerge in infectious diseases usually do not require β 2-GP I to bind to cardiolipin. Furthermore, they are not associated with the clinical symptoms of APS.

The overall interpretation of an ELISA test result should consider all clinical findings.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 2 days. For longer periods samples have to be stored at -20 °C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided.

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly. Samples have to be diluted 1 : 101 (v/v) with sample diluent.

Example: 10 μ L sample and 1000 μ L sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips can be stored at 2...8 °C until the printed expiration date. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

The microtiter plate with breakable 8-well strips is vacuum sealed with desiccant. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Dilute wash buffer (10x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water.

Except for the wash buffer all components included in the test kit are ready to use.

The substrate must be protected from direct light. The test should not be performed with substrate solution that is colored dark or contains colored precipitates.

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. Pipette 100 µL Calibrator 0 optional*
 100 µL Calibrators 1, 2, 3 and 4
 100 µL Positive control
 100 µL diluted sample each.
3. Cover the plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 3 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. 100 µL HRP conjugate per cavity or
 100 µL HRP conjugate per cavity.
6. Cover the plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 3 x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. 100 µL substrate per cavity.
9. Incubate for 15 min at RT **protected from light**.
10. 100 µL stop solution per cavity, mix gently.
11. Read OD at 450 nm and ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min following reaction stop.

* Note:

Using CAL 0 (1 U/mL) allows quantification of concentrations below the CAL 1 value (10 U/mL). If no quantification below the CAL 1 value is required, CAL 0 can be considered optional.

Evaluation of Results

A calibration curve is created by plotting the measured absorbances of the calibrators CAL 0 - 4 (y-axis) against the corresponding antibody concentrations (x-axis). Alternatively, a calibration curve can be created by plotting the measured absorbances of calibrators CAL 1 - 4 (y-axis) against the corresponding antibody concentrations (x-axis).

The 4-parameter regression model is recommended to create the calibration curve.

The absorbances of the diluted samples are converted to antibody concentrations U/mL by extrapolating from the calibration curve. The indicated concentrations of the calibrators already take into account a 1 : 101 dilution of the serum samples.

Measurements of samples with a higher absorbance than that of calibrator CAL 4 have to be repeated in a higher predilution. Results have to be multiplied with the factor of the additional dilution:

Sample volume	Added volume of sample diluent	Final volume	Dilution of original sample	Multiplication factor
10 µL	1000 µL	1010 µL	1 : 101 = Sample 1	-
500 µL Sample 1	500 µL	1000 µL	1 : 202 = Sample 2	2
500 µL Sample 2	500 µL	1000 µL	1 : 404 = Sample 3	4

Note that antibodies in dilutions may not be stable, which may lead to a loss of activity. For this reason, a reinvestigation should be performed in a higher dilution at the same day.

Interpretation of Results

Positive	≥ 10 U/mL
Negative	< 10 U/mL

Test validation

The test run is valid if

- adsorbance of calibrator CAL 0 $<$ CAL 1
- adsorbance of calibrator CAL 1 ≤ 0.70
- adsorbance of calibrator CAL 4 ≥ 1.20

If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (reagent preparation, incubation times and temperatures, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Performance Characteristics

Sensitivity and Specificity

IgG isotype

Sensitivity and specificity of Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM have been determined in a retrospective study with 196 samples in comparison to a commercially available ELISA. Discrepant samples were tested in a second commercially available ELISA.

n = 196	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	62	11*
Serazym® ELISA negativ	0	123

Sensitivity: 100.0 %

Specificity: 91.8 %

Samples labeled with * were retested in a second commercially available ELISA resulting in a corrected specificity of 93.9 %.

IgM isotype

Sensitivity and specificity of Serazym® Anti-Cardiolipin- β 2-GP I IgG/IgM have been determined in a retrospective study with 183 samples in comparison to a commercially available ELISA. Discrepant samples were tested in a second commercially available ELISA.

n = 183	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	43	9**
Serazym® ELISA negativ	2***	129

Sensitivity: 95.6 %

Specificity: 93.5 %

Samples labeled with ** and *** were retested in a second commercially available ELISA resulting in a corrected sensitivity of 97.9 % and a corrected specificity of 95.6 %.

Precision

For the determination of the intra-assay coefficient of variation (CV) 4 samples were measured in an 8-fold determination in one test run:

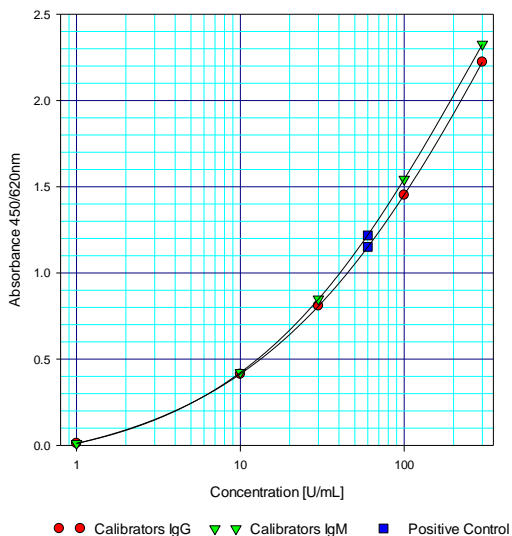
Sample	IgG		IgM	
	Concentration [U/mL]	CV [%]	Concentration [U/mL]	CV [%]
1	26.9	2.3	27.4	4.1
2	60.7	8.9	51.2	8.8
3	143.4	6.0	109.0	4.0
4	200.7	9.1	264.7	8.8

The inter-assay coefficient of variation (CV) was determined by a 3-fold determination of 4 samples in 8 different runs:

Sample	IgG		IgM	
	Concentration [U/mL]	CV [%]	Concentration [U/mL]	CV [%]
1	42.7	10.3	30.8	7.4
2	81.2	8.2	78.8	9.5
3	129.4	10.4	136.7	10.1
4	215.0	6.2	184.4	13.9

Calibration Curve

A typical calibration curve in Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP I IgG/IgM is shown below:



Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples do not interfere when present in concentrations of up to 500 mg/dL (hemoglobin), 1000 mg/dL (lipids) and 20 mg/dL (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors do not interfere with Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP IgG when present in concentrations of up to 500 IU/mL but may affect results with Serazym® Anti-Cardiolipin-β2-GP IgM.

Change History

Version	Section	Modifications
2022-11_v01_DE_EN	Entire document	Updating of the Intended Use Conversion of subsections Insertion of Safety Instructions Updating Important Information Updating Performance Characteristics (Sensitivity and Specificity)

References

1. Conrad K et al. (1999) "Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases". A Diagnostic Reference, Vol. 2, 42: 833-843.
2. Harris EN et al. (1983) "Anti-cardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus". *Lancet*, 11: 1211.
3. McNeil HP et al. (1990) "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*, 87: 4120-4124.
4. Miyakis S et al. (2006) "International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)". *J Thromb Haemost.*, 4(2): 295–306.
5. Ruiz-Irastorza G et al. (2010) "Antiphospholipid syndrome". *Lancet*, 376: 1498-509.