

RELISA® CARDIOLIPIN IgG- & IgM-ANTIKÖRPERTEST

Nur Zur *in vitro*-Diagnostik

Für Professionellen Gebrauch

Katalognummer: 7096-02 (96 Kavitäten) und 7696-02 (576 Kavitäten)

BEABSICHTIGTER VERWENDUNGSZWECK: Bei diesem Produkt handelt es sich um ein Enzym-Immuntestsystem zum Nachweis und zur Messung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Cardiolipin in humanem Serum. Die mit diesem Testsystem erzielten Ergebnisse können zur Einschätzung des Risikos von Thrombosesstörungen bei Patienten mit systemischem Lupus erythematosus oder Lupus-ähnlichen Syndromen herangezogen werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Antiphospholipide Antikörper, zu denen Anticardiolipin-Antikörper gehören, sind im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematosus häufig nachzuweisen (1). In zahlreichen Berichten werden diese Autoantikörper mit verschiedenen venösen und arteriellen Thrombosesstörungen, einschließlich zerebralem Infarkt (2), tiefer venöser Thrombose (3), Thrombozytopenie (1), Lungenembolie (4) und wiederholtem Verlust des Fötus mit Infarkt der Plazenta (5) in Verbindung gebracht. Unter „Lupus-Antikoagulans“ (6) versteht man eine Substanz, die einen aktivierten partiellen Thromboplastintest *in vitro* verlängert. Es wird ebenfalls mit den genannten klinischen Syndromen in Verbindung gebracht, ist jedoch nicht identisch mit Anticardiolipin-Antikörper. Die Termini „Lupus-Antikoagulans“ und „antiphospholipide Antikörper“ werden bisweilen fälschlicherweise synonym gebraucht, obwohl sich diese Immunoglobuline unterscheiden (1).

Bei diesem Testsystem von Immuno Concepts handelt es sich um einen Enzym-Immuntest in Mikrotiterplatten zum Nachweis von Anticardiolipin-Antikörpern in humanem Serum. Es ist bereits erwiesen, dass Festphasenimmuntests eine extrem sensible und spezifische Methode zum Nachweis von Anticardiolipin-Antikörpern darstellen (7-10). Das Testsystem von Immuno Concepts entspricht den international anerkannten, vom Antiphospholipid Standardization Laboratory vorgegebenen „Harris-Standards“ (9). Die damit erzielten objektiven Ergebnisse werden für IgG-Anticardiolipin-Antikörper als GPL-Einheiten und für IgM-Anticardiolipin-Antikörper als MPL-Einheiten bezeichnet.

FUNKTIONSWEISE DES TESTS

Dieser Test ist ein indirekter Enzym-Immuntest. Die Oberfläche der Mikrotiterplatten wurde mit einem stabilisierten Cardiolipin-Präparat beschichtet, das im System als Antigen dient. Kalibratorserum, Kontrollseren und verdünnte Patientenproben werden in die Kavitäten gegeben und inkubiert, so dass in der Probe vorhandene Anticardiolipin-Antikörper mit dem gebundenen Antigen in der Festphase reagieren können. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine werden abgewaschen und anschließend die Kavitäten mit antihumanen IgG- bzw. IgM-Antikörpern inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind. Das Testsystem enthält zwei Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper-Präparate. Eines davon ist human-IgG-spezifisch, das andere human-IgM-spezifisch. Die Konzentration von IgG-Anticardiolipin-Antikörpern bzw. IgM-Anticardiolipin-Antikörpern muss mittels dieser beiden Konjugate separat bestimmt werden.

Nach der Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-Konjugat wird in positiven Proben ein dreiteiliger Komplex gebildet. Dieser besteht aus einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-humanen Antikörper, gebunden an einen humanen Anticardiolipin-Antikörper, der wiederum an das auf der Plastikoberfläche stabilisierte Cardiolipin gebunden ist. Nach einem weiteren Waschvorgang wird dieser Komplex durch Addition einer Lösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂ als chromogenes Substrat nachgewiesen. Der Grad der Farbentwicklung in den Kavitäten ist proportional zur Konzentration von Anticardiolipin-Antikörpern in den Serumproben.

Jede Kavität wird in einem Spektrophotometer analysiert. Die Resultate ergeben sich aus dem Vergleich zwischen den Absorptionswerten der Kalibratorkavitäten und der Probenkavitäten.

SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG

Aufbewahrung: Sämtliche Komponenten sollten bei 2-10°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Nicht einfrieren.

Haltbarkeit: Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum haltbar. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.

REAKTIVE REAGENZIEN

Mit Cardiolipin beschichtete Mikrotiterplattenstreifen **PLATE:** Katalognummer 7008-01. Ein Mikrotiterplattenrahmen mit zwölf Streifen je acht Kavitäten, beschichtet mit einer stabilisierten Lösung aus Diphosphatidyl-Glycerol (Cardiolipin) aus Rinderherz. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden, können einzelne Kavitäten abgetrennt werden. Unbenutzte Streifen können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Probenverdünner **SOLN|DIL:** Katalognummer 7100 (100 ml). Spezieller gepufferter Probenverdünner zur Verdünnung der Patientenproben. Dieser Verdünner enthält Apolipoprotein-H-Cofaktor.

Anticardiolipin IgG- Antikörper Positivkontrollserum **CONTROL| +:** Katalognummer 7021-02G. Fläschchen mit 1,5 ml gebrauchsfertigem Human-Anticardiolipin-Positivkontrollserum. Dieses Serum enthält IgG-Anticardiolipin-Antikörper. Siehe Flaschenetikett für die zu erwartende GPL Werte.

Anticardiolipin IgM- Antikörper Positivkontrollserum **CONTROL| +:** Katalognummer 7021-02M. Fläschchen mit 1,5 ml gebrauchsfertigem Human-Anticardiolipin-Positivkontrollserum. Dieses Serum enthält IgM-Anticardiolipin-Antikörper. Siehe Flaschenetikett für die zu erwartende MPL Werte.



Anticardiolipin-Antikörper-Negativkontrollserum **CONTROL| -:** Katalognummer 7031-01. Fläschchen mit 2 ml gebrauchsfertigem Human-Anticardiolipin-Negativkontrollserum. Die GPL- und MPL-Werte sollen unter 5,0 Einheiten liegen.



Anticardiolipin-IgG-Antikörper-Kalibratorserum **CAL:** Katalognummer 7026-02G. Fläschchen mit 1,5 ml gebrauchsfertigem Human-Anticardiolipin-IgG-Positivkalibratorserum. Siehe Flaschenetikett für zu erwartende Anticardiolipin-Antikörperkonzentrationen in GPL-Einheiten.

Anticardiolipin-IgM-Antikörper-Kalibratorserum **CAL:** Katalognummer 7026-02M. Fläschchen mit 1,5 ml gebrauchsfertigem Human-Anticardiolipin-IgM-Positivkalibratorserum. Siehe Flaschenetikett für zu erwartende Anticardiolipin-Antikörperkonzentrationen in MPL-Einheiten.

Enzym-Antikörper-Reagens - spezifisch für humanes IgG **CONJ|HRP:** Katalognummer 7009-02G (14 ml). Anti-Human-IgG, an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens.

Enzym-Antikörper-Reagens - spezifisch für humanes IgM **CONJ|HRP:** Katalognummer 7009-02M (14 ml). Anti-Human-IgM, an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens.

Substratlösung **SOLN|SUB**   : Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-spezifische Enzymsubstratlösung, enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Gebrauchsfertiges Reagens. **ACHTUNG:** Entzündlich. Dieses Reagenz enthält weniger als 25% Methanol und Azeton. Es darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. Bei Kontakt mit den Augen sofort gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.

Stopplösung **SOLN|STOP**   : Katalognummer 7033 (14 ml). Spezielle Stopplösung für EIA-Testsysteme von Immuno Concepts. Gebrauchsfertiges Reagens. **GEFAHR:** Korrosiv. Dieses Reagens enthält Chlorwasserstoff- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

Streifenhalter

PBS-Waschpuffer **PWDR|PBS**: Katalognummer 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. Zwei Beutel je 96er-Mikrotiterplatte sind im Lieferumfang des Testkits enthalten.

Herstellung: Einen Beutel Pulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen und speichern Sie zwischen 2-25°C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind. ZU DIESEM PUFFER KEIN TWEEN 20 ODER ANDERE DETERGENZIEN HINZUFÜGEN.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT MIT GELIEFERT

Präzisionspipetten für Volumina von 10-1000 µl
Spritze für die Zugabe von Waschpufferlösung in die Kavitäten der Mikrotiterplatten, oder automatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
1-Liter-Behälter für den PBS-Waschpuffer
Deionisiertes oder destilliertes Wasser
Spektrophotometer für Mikrotiterplatten für Absorptionsmessungen bei 450 nm
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen
Saugpapier oder Papierhandtücher
Mehrkanal-Pipette für bis zu 8 Kavitäten
Einmalhandschuhe
Laborstoppuhr

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche für dieses Produkt verwendeten Materialien menschlichen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kitbestandteile wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Kontrollseren, Kalibratorseren und Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Die Kontroll- und Kalibratorseren enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid (0,09%). Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
4. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
5. Die für Anticardiolipin-Tests vorgesehenen Serumproben nicht durch Hitzeeinwirkung deaktivieren. Inaktivierung durch Hitze kann erhöhte Werte zur Folge haben.
6. Das Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
7. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.
8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Während der Tests müssen die Proben in den Kavitäten der Mikrotiterplatten verbleiben.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Mikrotiterstreifen und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.

16. Das Stoppreagens ist korrosiv und kann Verbrennungen verursachen. Dieses Reagens enthält Chlorwasserstoff- und Schwefelsäure (jeweils weniger als 3 % Volumenanteil) und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Für Kinder unzugänglich aufbewahren. Bei Kontakt mit Augen, sofort und gründlich mit Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Dieses Reagens niemals mit Wasser verdünnen.

PROBENGEWINNUNG

Probenahme: Nach Möglichkeit sollten Serumproben hergestellt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutentnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-25°C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

Immuno Concepts rät wegen einer möglichen Kontamination mit Blutplättchen von der Verwendung von Plasma für diesen Test ab. Plättchen können durch Reaktion mit antiphospholipiden Antikörpern die Ergebnisse beeinträchtigen.

ACHTUNG: Die für Anticardiolipin-Tests vorgesehenen Serumproben nicht durch Hitze einwirkung deaktivieren. Inaktivierung durch Hitze kann erhöhte Werte zur Folge haben.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil diese Zustände zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden.

ACHTUNG: Wiederholtes Einfrieren / Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.

ALLGEMEINE HINWEISE ZUM VERFAHREN

1. Vor Verwendung müssen unbedingt alle Serumproben und Kitbestandteile auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden. Ein Liter Waschpuffer benötigt mehrere Stunden, um nach Entnahme aus dem Kühlschrank auf 20°C zu kommen. Bei Inkubationstemperaturen außerhalb des hier angegebenen Bereichs können die Ergebnisse verfälscht werden. Unverbrauchte Proben und Kitmaterialien müssen nach Verwendung wieder gekühlt werden.
2. Reagenzien vor dem Test durch vorsichtiges Umdrehen der Flasche gut durchmischen. Auf keinen Fall schütteln oder auf einen Mischer stellen. Schaumbildung vermeiden.
3. Beim Herstellen der Probenverdünnungen müssen die Pipettenspitzen vor der Zugabe von Serum in den Probenverdünner abgewischt werden. Außen an der Pipette anhaftendes überschüssiges Probenmaterial kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette wird empfohlen, weil dadurch die Zugabe, die Inkubationszeit und die Reaktionszeit gleichmäßiger ausfallen.
5. **Sorgfältiges Waschen der Kavitäten ist von entscheidender Bedeutung.** Unzureichendes Waschen der Kavitäten führt zu hohen Hintergrundwerten und unter Umständen zu falsch-positiven Ergebnissen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavitäten aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Eine Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten ist unbedingt zu vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Die Platten umdrehen und in der Luft kräftig ausschlagen, um alle Waschlösung aus den Kavitäten zu entfernen. Der Waschvorgang muss 3 bis 5 Mal wiederholt werden. Danach die Platten auf einem Papierhandtuch oder vergleichbarem Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird. Die Verwendung eines automatischen Waschgeräts für Mikrotiterplatten wird empfohlen, weil dies zu gleichmäßigeren Waschergebnissen führt.
HINWEIS: Auf Grund der verschiedenen Waschtechniken und Automatiksysteme muss die Anzahl der Waschgänge evtl. angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Jedes Labor muss für sein Waschsystem die Anzahl von Waschgängen mit der höchsten Effizienz selbst bestimmen.
6. Unzureichende Entfernung von Waschpufferrückständen kann zu inkonsistenter Farbentwicklung führen. Die Streifen sollten in der Luft kräftig ausgeschlagen und auf Papierhandtuch ausgelegt werden, um Waschpufferrückstände zu minimieren.
7. Die bei den Inkubationsschritten angegebene Zeitdauer muss unbedingt eingehalten werden. Alle Serumproben müssen vor Versuchsbeginn verdünnt und möglichst schnell hintereinander (in maximal fünf Minuten) in die Kavitäten dispensiert werden. Die Testserien dürfen nur so groß sein, dass diese Zeit bequem eingehalten werden kann.
8. Mit Ausnahme des letzten Inkubationsschritts (Substratlösung) beginnt jede Inkubationsperiode nach beendigter Proben- oder Reagenzienzugabe. Die Inkubation mit Substratlösung muss für jede Kavität genau 15 Minuten dauern. Daher müssen Proben und Reagenzien in derselben Reihenfolge und im selben zeitlichen Abstand zugegeben werden.

- Kein Tween 20, Triton X-100 oder andere Reiniger in den Waschpuffer oder in andere Reagenzien aus diesem Test zumischen.

ERGEBNISSE

BERECHNUNGEN

- Den Absorptionswert der IgG-Leerkavität von den Absorptionswerten des IgG-Kalibrators, der Kontrollseren und Patientenproben abziehen. Den Absorptionswert der IgM-Leerkavität von den Absorptionswerten des IgM-Kalibrators, der Kontrollseren und Patientenproben abziehen. Den mittleren Absorptionswert von Doppelbestimmungen ermitteln.
- Die Anticardiolipin-Antikörperkonzentration des Kalibratorserums (auf dem Etikett vermerkt) wird durch den mittleren Absorptionswert der Kalibratorkavitäten dividiert, um den Konvertierungsfaktor zu ermitteln. Für IgG und IgM werden separate Konvertierungsfaktoren ermittelt.
- Die Absorptionswerte jeder Probe werden mit dem Konvertierungsfaktor multipliziert, um die Anticardiolipin-Antikörperkonzentration in GPL- bzw. MPL-Einheiten zu ermitteln.

QUALITÄTSSICHERUNG

- Der mittlere Absorptionswert der Kalibratorkavitäten muss bei mindestens 0,400 liegen.
- Die leere Kontrollkavität muss einen Absorptionswert von unter 0,150 haben. Höhere Absorptionsleerwerte als 0,150 sind als Hinweis auf unzureichendes Waschen oder Kontamination der Reagenzien zu interpretieren.
- Die für positive und negative Kontrollseren ermittelten Anticardiolipin-Antikörperwerte sollten innerhalb der auf dem Etikett angegebenen Bereiche liegen. Diese Bereiche wurden so festgelegt, dass 95% der innerhalb der statistisch normalen Variation zu erwartenden Werte abgedeckt werden. Gelegentliche kleinere Abweichungen von diesen Bereichen sind nicht ungewöhnlich. Jedes Labor muss eigene Akzeptanzkriterien auf Basis der Erfahrungen mit diesem Test festlegen.
- Die klinische Bedeutung von Anticardiolipin-Antikörperwerten wird noch untersucht. Proben mit höheren spezifischen Anticardiolipin-Antikörperwerten als die Obergrenze des Kalibrators sind positiv zu befunden mit einem Wert von "größer oder gleich als" der Wert welcher auf dem Etikett des Kalibratorserums angegeben ist.
- Der Konvertierungsfaktor muss für jeden Durchlauf separat berechnet werden. Wenn Konvertierungsfaktoren aus anderen Durchläufen oder GPL- statt MPL-Konvertierungsfaktoren (oder umgekehrt) verwendet werden, werden die Ergebnisse unbrauchbar.
- Jedes Labor muss seine eigenen (normalen) Referenzwerte auf der Basis der Patientenpopulation und anderer lokaler Faktoren festlegen. Siehe „Leistungsfähigkeit des Tests, klinische Spezifität“ als Beispiel.

ERWARTETE WERTE

REFERENZBEREICH

Die klinische Bedeutung von Anticardiolipin-Antikörpern wird nach wie vor erforscht. Die Mehrzahl der Forscher stimmt jedoch überein, daß die klinische Signifikanz von niedrigtitrigen Befunden von Anticardiolipin Antikörpern nicht aussagekräftig ist (17,18)

Ausgehend von unseren Testergebnissen (siehe Testcharakteristika) und der Beobachtung, daß Patienten mit einem Antiphospholipidsyndrom üblicherweise mittlere bis hohe Titer von Anticardiolipin Antikörpern aufweisen, empfehlen wir die folgenden Referenzwerte:

hoch = über 80 GPL- bzw. MPL-Einheiten
mittel = 20 bis 80 GPL- bzw. MPL-Einheiten
normal = weniger als 20 GPL- bzw. MPL-Einheiten

Es wird empfohlen, daß jedes Labor eine eigene Studie zur Verteilung der Normalwerte durchführt.

ZU ERWARTENDE ANTEILE VON ANTIKÖRPERN

In zahlreichen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Anticardiolipin-Antikörpern und systemischem Lupus erythematosus nachgewiesen (1, 7, 8, 11-16). In diesen Studien lag der Anteil von IgG-Anticardiolipin-Antikörpern im Bereich von 23% bis 54% (Mittel 41,4%) und der Anteil von IgM-Anticardiolipin-Antikörpern zwischen 5% und 41% (Mittel 25,5%). Die unterschiedlichen Anteile in diesen Studien sind wahrscheinlich auf die Patientenauswahlkriterien, die untersuchten Patientenpopulationen oder die Einstufung von Antikörperspiegeln als signifikant zurückzuführen. Mit dem Immuno Concepts Anticardiolipin-Antikörper-Testsystem wurden Serumproben von 58 Patienten getestet, die wegen rheumatischer Beschwerden den Arzt aufgesucht hatten. Diese Patientenpopulation wurde auf Grund ihrer klinischen rheumatischen Erkrankungen ausgewählt, nicht jedoch auf Grund eines spezifischen Krankheitsstadiums oder einer spezifischen thrombotischen Vorgeschichte. In dieser Population testeten 56 Proben (96,6%) negativ für IgG-Anticardiolipin-Antikörper (27 Proben mit weniger als 5 GPL-Einheiten und 29 Proben im Bereich von 5-20 GPL), zwei Proben (3,4%) wiesen mittlere IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte auf und keine Probe hatte hohe IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte. Eine Probe (1,7%) war positiv für IgM-Anticardiolipin-Antikörper im mittleren Bereich.

BESCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis von Anticardiolipin-Antikörper-Titrierungen eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.
2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für Anticardiolipin-Antikörper mit diesem Test sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Falls der Patient negativ auf Anticardiolipin-Antikörper testet, die klinischen Ergebnisse jedoch auf das Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern schließen lassen, empfehlen einige Forscher, auf Lupus-Antikoagulans als Bestätigung der negativen Anticardiolipin-Ergebnisse zu testen. Wenn die Ergebnisse für Anticardiolipin-Antikörper oder Lupus-Antikoagulans positiv sind, ist der Patient als positiv für Antiphospholipid-Antikörper zu bewerten (1).
4. Bei Patienten mit serologisch positiven Syphilisinfektionen kann das Testergebnis für Anticardiolipin-Antikörper positiv sein. Bei diesen Patienten wird das Risiko von Thrombosen im Allgemeinen als nicht höher eingeschätzt als bei rheumakranken Patienten mit Anticardiolipin-Antikörpern. 17 Proben von Patienten mit aktiver oder serologisch nachgewiesener Syphilis (FTA-Abs und/oder MHA-TP positiv) wurden mit dem Immuno Concepts Relisa[®] Cardiolipin IgG- & IgM-Antikörper-Testsystem getestet. Zwölf (70,6%) dieser Proben waren positiv für IgG-Anticardiolipin-Antikörper, drei (17,6%) waren zusätzlich zu den IgG-Antikörpern positiv für IgM-Anticardiolipin-Antikörper. Die Diagnose von Syphilis sollte durch spezifische antitreponemale Antikörper-Tests bestätigt oder ausgeschlossen werden.
5. Anticardiolipin-Antikörper können bei vielen Infektionen vorübergehend auftreten. Wenn ein Patient ein positives Testergebnis aufweist und klinische Anzeichen einer Infektion vorliegen, sollte der Test nach Abklingen der Infektion wiederholt werden.
6. Rheumatische Faktoren können Festphasentests für IgM-Antikörper beeinträchtigen, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.
7. In veröffentlichten Studien an Patienten mit systemischem Lupus erythematosus lag der Anteil von IgG-Anticardiolipin-Antikörpern im Bereich von 23% bis 54% und der Anteil von IgM-Anticardiolipin-Antikörpern im Bereich von 5% bis 41%.
8. Die klinische Bedeutung von Anticardiolipin-Antikörpern wird noch untersucht. Die mit diesem Testsystem nachgewiesenen Antikörperwerte lassen nicht unbedingt auf die Schwere oder Dauer einer Erkrankung schließen.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

KLINISCHE SPEZIFITÄT

Normale Kontrollseren: Serumproben von 330 gesunden Blutspendern wurden mit dem Immuno Concepts Anticardiolipin-Antikörper-Testsystem getestet. In dieser Population waren 327 Proben (99,1%) negativ für IgG-Anticardiolipin-Antikörper (246 Proben mit weniger als 5 GPL-Einheiten und 81 Proben im Bereich von 5-20 GPL), drei Proben (0,9%) wiesen mittlere IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte auf und keine Probe hatte hohe IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte. Von den für IgM-Anticardiolipin-Antikörper getesteten Proben waren 329 Proben (99,7%) negativ (318 Proben mit weniger als 5 MPL-Einheiten und 11 Proben im Bereich von 5-20 MPL), eine Probe (0,3%) wies mittlere IgM-Anticardiolipin-Antikörperwerte auf und keine Probe hatte hohe IgM-Anticardiolipin-Antikörperwerte.

Rheumatische Kontrollseren: Serumproben von 20 Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen als SLE, in deren Krankengeschichte keine Thrombosen verzeichnet waren, wurden mit dem Immuno Concepts Anticardiolipin-Antikörper-Testsystem getestet. Keine dieser Proben war positiv für IgG- oder IgM-Anticardiolipin-Antikörper.

KLINISCHE SENSIBILITÄT

Mit dem Immuno Concepts Anticardiolipin-Antikörper-Testsystem wurden Serumproben von 58 Patienten getestet, die wegen rheumatischer Beschwerden den Arzt aufgesucht hatten. Diese Patientenpopulation wurde auf Grund ihrer klinischen rheumatischen Erkrankungen ausgewählt, nicht jedoch auf Grund eines spezifischen Krankheitsstadiums oder einer spezifischen thrombotischen Vorgeschichte. In dieser Population waren 56 Proben (96,6%) negativ für IgG-Anticardiolipin-Antikörper (27 Proben mit weniger als 5 GPL-Einheiten und 29 Proben im Bereich von 5-20 GPL), zwei Proben (3,4%) wiesen mittlere IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte auf und keine Probe hatte hohe IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerte. Eine Probe (1,7%) war positiv für IgM-Anticardiolipin-Antikörper im mittleren Bereich.

Dieselben Proben wurden nach der ELISA Anti-Cardiolipin-Referenzmethode getestet, wobei in denselben beiden Proben IgG-Anticardiolipin-Antikörper und in derselben einzelnen Probe IgM-Anticardiolipin-Antikörper gefunden wurden. Damit wurde für das Immuno Concepts Testsystem im Vergleich zur Referenzmethode eine Sensibilität von 100% und eine Spezifität von 100 % sowohl für IgG-Anticardiolipin-Antikörper als auch für IgM-Anticardiolipin-Antikörper nachgewiesen.

Serumproben von 32 Patienten mit SLE, in deren Krankengeschichte mindestens eine Thrombose aufgetreten war, wurden mit dem Immuno Concepts Anticardiolipin-Antikörper-Testsystem getestet. Sieben dieser Proben hatten IgG-Anticardiolipin-Antikörper im mittleren Wertebereich. Zusätzlich zu IgG-Anticardiolipin-Antikörpern wies eine Probe IgM-Anticardiolipin-Antikörper im mittleren Wertebereich auf.

TESTGENAUIGKEIT

Acht Proben mit bekannten IgG-Anticardiolipin-Antikörperwerten wurden jeweils bei neun verschiedenen Gelegenheiten getestet. Für diese Proben lag der Variationskoeffizient (VK) zwischen Tests im Bereich von 6,4% bis 10,4% (Mittel 9,2%) und der VK für GPL-Werte zwischen Tests im Bereich von 1,9% bis 10,0% (Mittel 8,7%).

Acht Proben mit bekannten IgM-Anticardiolipin-Antikörperwerten wurden jeweils bei neun verschiedenen Gelegenheiten getestet. Für die Absorptionswerte dieser Proben lag der Variationskoeffizient (VK) zwischen Tests im Bereich von 8,0% bis 10,0% (Mittel 8,7%) und der Variationskoeffizient für GPL-Werte zwischen Tests im Bereich von 1,9% bis 10,0% (Mittel 7,7%).

Je zwei Proben, die als positiv für IgG- bzw. IgM-Anticardiolipin-Antikörper bekannt waren, wurden mit jeweils 10 Replikaten getestet. Die Tabelle 1 enthält die KV-Ergebnisse innerhalb Tests dieser Proben.

TABELLE 1

Probe	Anticardiolipinwert	KV innerhalb Tests (abs)	KV innerhalb Tests (Einheiten)
IgG niedrig positiv	13 GPL-Einheiten	2,4%	5,1%
IgG mittel positiv	70 GPL-Einheiten	9,6%	7,1%
IgM niedrig positiv	9 MPL-Einheiten	5,0%	11,5%
IgM mittel positiv	25 MPL-Einheiten	9,5%	7,0%

NACHBILDUNG

Zwei Proben mit bekannten GPL-Werten, eine davon niedrig, die andere mittel, wurden zu gleichen Teilen mit Standardflüssigkeiten verdünnt, die bekannte Mengen an IgG-Anticardiolipin-Antikörpern enthielten. Die Tabelle 2 enthält die errechneten und beobachteten Werte und den Nachbildungsprozentwert

TABELLE 2

Probe	errechneter GPL	beobachteter GPL	Nachbildung (%)
niedrig positiv	-	9,0	-
niedrig positiv +10	10	11,0	110
niedrig positiv +20	14,5	14,3	99
niedrig positiv +40	24,5	25,3	103
niedrig positiv +60	34,5	35,7	103
mittel positiv	-	54,0	-
mittel positiv +10	32,0	32,3	101
mittel positiv +20	37,0	38,1	103
mittel positiv +40	47,0	46,4	99
mittel positiv +60	57,0	57,7	101

Zwei Proben mit bekannten MPL-Werten, eine davon niedrig, die andere mittel, wurden zu gleichen Teilen mit Standardflüssigkeiten verdünnt, die bekannte Mengen an IgM-Anticardiolipin-Antikörpern enthielten. Die Tabelle 3 enthält die errechneten und beobachteten Werte und den Nachbildungsprozentsatz.

TABELLE 3

Probe	errechneter MPL	beobachteter MPL	Nachbildung (%)
niedrig positiv	-	8,0	-
niedrig positiv +5	7,5	7,3	97
niedrig positiv +10	9,0	9,2	102
niedrig positiv +20	14,0	14,3	102
niedrig positiv +30	19,0	18,8	99
mittel positiv	-	25,0	-
mittel positiv +5	15,0	14,5	97
mittel positiv +10	17,5	17,9	103
mittel positiv +20	22,5	22,1	98
mittel positiv +30	27,5	27,8	101

BIBLIOGRAPHIE

- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anti-phospholipid Antibodies. Clin. Rheum. Dis. 11:591-609, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Asherson, R.A., et al. Cerebral infarction in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. Clin. Exp. Rheumatol. 2:47-51, 1984.
- Mueh, J.R., Herbst, K.D., Rapaport, S.I. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann. Intern Med. 92:156-159, 1980.
- Anderson, N.E., Ali, M.R. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism and fatal pulmonary hypertension. Ann. Rheum. Dis. 43:760-763, 1984.
- Derue, G.J., Englert, H.J., Harris, E.N., et al. Fetal loss in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. J. Obstet. Gynaecol. 5:207-209, 1985.
- Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., Elkon, K.B., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Brit. Med. J. 287:1021-1023, 1983.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin Antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus Erythema-tosus. Lancet ii:1211-1214, 1983.
- Loizou, S., McCrea, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., and Harris, E.N. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Immunol 62:738-745, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arth. Rheum. 30:835-837, 1987.
- Harris, E.N. Solid-phase anticardiolipin test revisited. Am. J. Med. 85:599-601, 1988.
- Colaco, C.B., Male, D.K. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. Clin. Exp. Immunol. 59:449-456, 1985.
- McHugh, N.J., Maymo, J., Skinner, R.P., James, I., and Maddison, P.J. Anticardiolipin antibodies, livedo reticularis, and major cerebrovascular and renal disease in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 47:110-115, 1988.
- Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H., and Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 56:193-199, 1984.
- Cronin, M.E., Biswas, R.M., Van der Straeton, C., Fleisher, T.A., and Klippel, J.H. IgG and IgM Anticardiolipin Antibodies in Patients with Lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol. 15:795-798, 1988.
- Sturfelt, G., Nived, O., Norberg, R., Thorstensson, R., and Krook, K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 30:382-388, 1987.
- Ishii, Y., Nagasawa, K., Mayumi, T., and Niho, Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 49:387-390, 1990.
- Wilson, W. A., Gharavi, A.E., Koike, T., Lockshin, M.D., Branch, D.W., Piette, J.C., Brey, R., Derksen, R., Harris, E.N., Hughes, G.R., Triplett, D.A., and Khamashta, M.A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arth. Rheum. 42:1309-1311, 1999.
- Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H.W.M., de Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Kriilis, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 4:295-306, 2006.

Im Falle der Beschädigung der Schutzverpackung treten Sie vor Gebrauch bitte mit Immuno Concepts in Verbindung.



Hersteller



Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft



Temperatur-Beschränkung



Enthält genügendes für <n> Tests



Beachten Sie die Anwendungsvorschriften



In vitro Medizinische Diagnoseeinheit



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

RELISA® CARDIOLIPIN IgG ET IgM ANTIKÖRPER- TESTVERFAHREN

Vor der Testdurchführung müssen alle Proben, Reagenzien (auch der Waschpuffer) und Mikrotiterstreifen auf Zimmertemperatur gebracht werden.

- 1. ARBEITSBLATT AUSFÜLLEN**
In das mit dem Kit gelieferte Arbeitsblatt die Lage der Proben in den Mikrotiterplatten eintragen. Eine Kavität wird als Leerwert für IgG verwendet, eine zweite Kavität als Leerwert für IgM. Es wird empfohlen, jede Patientenprobe, jeden Kalibrator und jedes Kontrollserum sowohl für IgG- als auch für IgM-Anticardiolipin-Antikörper doppelt zu testen, bis eine für das Labor akzeptable Bestimmungsgenauigkeit erzielt wird.
- 2. PBS-WASCHPUFFER GEBRAUCHSFERTIG MACHEN**
Inhalt eines Beutels mit PBS-Pufferpulver in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt (2-25°C) bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.
- 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN**
Patientenproben durch Zugabe von 10 µl Patientenserum zu 990 µl Probenverdünner 1:100 verdünnen und gut durchmischen. Der Kalibrator und die Kontrollseren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.
- 4. MIKROTITERSTREIFEN VORBEREITEN**
Die benötigte Anzahl Streifen aus den Beuteln entnehmen und in den Halter einsetzen. Die Streifen müssen fest im Rahmen sitzen. Drücken Sie an beiden Enden des Streifens bis dieser sicher im Rahmen einrastet. Falls nur einzelne Kavitäten oder kein voller Streifen verwendet wird ist zu überprüfen ob jede Kavität fest sitzt. Streifen die korrekt im Halter sitzen können beim Umdrehen des Halters dann nicht herausfallen. Wenn weniger als acht Kavitäten für den Ansatz benötigt werden können diese durch abknicken getrennt werden. Unbenutzte Streifen oder Kavitäten können im Folienbeutel mit Trocknungsmittel verpackt und mit Klebestreifen versiegelt bis zu 45 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- 5. SERUMVERDÜNNUNGEN AUFTRAGEN**
Je 100 µl Kalibrator, Kontrollseren und Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, wie im Arbeitsblatt eingetragen. 100 µl Probenverdünner in die für den Leerwert vorgesehene Kavität pipettieren.
- 6. STREIFEN INKUBIEREN** (30 Minuten bei Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)
Die Streifen bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubieren lassen. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Es wird empfohlen, die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abzudecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.
- 7. STREIFEN WASCHEN** (siehe auch Allgemeine Hinweise zum Verfahren, Punkte 5 und 6)
Kavitäten drei bis fünf Mal mit PBS-Waschpufferlösung auswaschen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavität aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Durch Umdrehen und kräftiges Ausschlagen in der Luft die Waschlösung vollständig aus den Kavitäten entfernen. Der Waschvorgang muss drei bis fünf Mal wiederholt werden. Danach die Streifen auf einem Papierhandtuch oder einem vergleichbaren Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird.
- 8. ENZYM-ANTI-KÖRPER-REAGENS ZUGEBEN**
100 µl Anti-IgG-Enzym-Antikörperreagens in jede der Kavitäten für IgG-Leerwert, GPL-Kalibrator, IgG-Kontrollseren und IgG-Patientenproben pipettieren. 100 µl Anti-IgM-Enzym-Antikörperreagens in jede der Kavitäten für IgM-Leerwert, MPL-Kalibrator, IgM-Kontrollseren und IgM-Patientenproben pipettieren.
- 9. STREIFEN INKUBIEREN** (30 Minuten bei Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)
Die Streifen 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren lassen. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein. Es wird empfohlen, die Streifen mit Klebeband oder einem Papierhandtuch abzudecken, um sie vor Staub und anderen Fremdkörpern zu schützen.
- 10. KAVITÄTEN WASCHEN**
Kavitäten drei bis fünf Mal mit PBS-Waschpufferlösung auswaschen. Beim Auswaschen von Hand den Inhalt der Kavität aspirieren, anschließend die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Kreuzkontamination zwischen den Kavitäten vermeiden, vor allem beim ersten Waschgang nach dem Absaugen. Durch Umdrehen und kräftiges Ausschlagen in der Luft die Waschlösung vollständig aus den Kavitäten entfernen. Der Waschvorgang muss drei bis fünf Mal wiederholt werden. Danach die Streifen auf einem Papierhandtuch oder einem vergleichbaren Material ausklopfen, so dass der Waschpuffer vollständig entfernt wird.
- 11. SUBSTRATLÖSUNG ZUGEBEN**
Eine Laborstoppuhr verwenden, um sicherzustellen, dass die Zeiten genau eingehalten werden. 100 µl Substratlösung in jede Kavität pipettieren. Die Substratlösung muss in gleichmäßigen Zeitabständen zugegeben werden, damit sichergestellt ist, dass jede Kavität exakt 15 Minuten inkubiert wird. In Kavitäten, die positive Proben enthalten, verfärbt sich die Lösung blau. In den anderen Kavitäten bleibt die Lösung farblos oder wird nur schwach blau.
- 12. STREIFEN INKUBIEREN** (genau 15 Minuten bei Zimmertemperatur, d. h. 18-25°C)
Die Streifen genau 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren lassen. Während dieser Zeit müssen die Streifen vor Luftzug oder Temperaturschwankungen geschützt sein.
- 13. STOPPREAGENS ZUGEBEN**
Nachdem die erste Kavität genau 15 Minuten inkubiert wurde, mit dieser anfangen und im selben Rhythmus wie bei der Substratlösung in jede Kavität 100 µl Stopplösung zugeben. Bei Zugabe der Stopplösung verfärbt sich blaue Substratlösung gelb, während farblose Lösung farblos bleibt.
- 14. ABSORPTION MESSEN**
Die Absorption der Kavitäten muss innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stoppreagens mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer gemessen werden. Die Kavitäten werden bei 450 nm um den Leerwert bereinigt gemessen. Wenn die Möglichkeit besteht, bei einer zweiten Wellenlänge zu messen, auch bei 600-650 nm als Referenzwellenlänge messen. Wenn die Messung bei 450 nm ohne Referenzwellenlänge erfolgt, sind die ermittelten Absorptionswerte höher.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG: +1-916-363-2649
oder via E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com