



# EIASON<sup>®</sup> Aquaporin-4 Ab V2



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörper gegen AQP4  
in Humanserum

## Gebrauchsanweisung

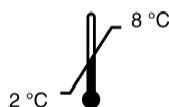
Nur für den in-vitro-Diagnostik Gebrauch

Produkt von










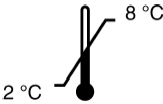








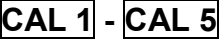



**IASON** GmbH  
Feldkirchner Straße 4  
A – 8054 Graz-Seiersberg  
Tel.: +43 (0)316 28 43 00  
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113  
Email: [office@iason.eu](mailto:office@iason.eu)  
[www.iason.eu](http://www.iason.eu)

REF E07-050-96-2



## Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Positivkontrollen
	Bestellnummer		Negative Kontrolle
	Hergestellt von		Biotin
	Verwendbar bis		Puffer zur Rekonstitution von 
	Lagerung bei		Streptavidin Peroxidase
	Europäische Konformität		Puffer zur Verdünnung von 
	Chargenbezeichnung		Substrat
	Mikrotiterplate		Stopplösung
	Kalibratoren		Konzentrierte Waschlösung

*Nur für den in-vitro-Diagnostik Gebrauch.*

## Verwendungszweck

Der EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen AQP4 in Humanserum. Nur zum Gebrauch für den professionellen Anwender. Neuromyelitis optica (NMO), auch als Devic's Syndrom bezeichnet, ist eine immunvermittelte neurologische Erkrankung, die das Rückenmark und die Sehnerven betrifft. Diese Erkrankung differiert von Multipler Sklerose (MS). Ein Serum-Immunglobulin G-Autoantikörper (NMO-IgG) hat sich als

ein spezifischer Marker für NMO herausgestellt und der Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) wurde als Antigen für NMO-IgG identifiziert. Die Messung von AQP4 Autoantikörper kann von erheblicher Bedeutung in der Unterscheidung zwischen NMO von MS sein, wenn sie hinsichtlich klinischer Merkmale möglicherweise nicht offensichtlich ist und eine Frühintervention somit eine Verhinderung oder Hinauszögerung von Funktionsstörungen bewirken kann.

## Messprinzip

Im EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit können AQP4 Ab in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen mit dem auf ELISA-Plattenvertiefungen beschichteten AQP4 und dem biotinylierten AQP4 (AQP4-Biotin) in flüssiger Phase interagieren. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wird der Inhalt der Vertiefungen verworfen. AQP4 Ab, welches an das auf der Vertiefung beschichtete AQP4 gebunden ist, interagiert auch mit AQP4-Biotin durch die Fähigkeit von AQP4 Ab in den Proben zweiwertig zu wirken wobei AQP4-Biotin über eine AQP4 Ab-Brücke an die Vertiefung gebunden bleibt. Die Menge des gebundenen AQP4-Biotins wird dann in einem zweiten Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD), die spezifisch an Biotin bindet, bestimmt. Überschüssige, ungebundene Streptavidin-Peroxidase wird dann gewaschen, und die Zugabe des Peroxidase-Substrats, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), führt zur Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch die Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wodurch sich der Inhalt der Vertiefungen gelb färbt. Die Absorption der gelben Reaktionsmischung bei 450 nm und 405 nm wird dann mit einem ELISA-Photometer abgelesen. Eine höhere Absorption zeigt das Vorhandensein von AQP4-Autoantikörper in der Testprobe an. Das Ablesen bei 405 nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Absorptionen. Es wird empfohlen, Werte unter 10 u/mL bei 450 nm zu messen. Wenn es möglich ist, nur bei einer Wellenlänge zu messen, kann 405 nm verwendet werden. Das Messintervall beträgt 3,0 - 80 u/mL (willkürliche IASON-Einheiten).

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

**VORSICHT:** Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Rohmaterial humanen Ursprungs, das in diesem Kit zum Einsatz kommt ist negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper geprüft. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

## Sicherheitsaspekte

SAPOD

**Signalwort:** Achtung



**Gefahrenhinweis:**

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

**Sicherheitshinweise:**

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen

P333 + P313: Bei Hautreizung oder- ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

**Beschädigte Testkits**

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma IASON GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde.

## Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatums stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

## Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Zu analysierende Seren sollten bald nach der Trennung getestet oder gelagert werden, vorzugsweise in Teilmengen, bei oder unter –20°C. Für einen Assay reichen 100 µL aus (50 µL-Doppelbestimmung). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhung der Lagertemperatur sollte vermieden werden. Verwenden Sie keine lipämischen oder hämolysierten Proben. Studien, in denen EDTA-, Citrat- und Heparinplasma-proben mit AQP4-Ab-positiven Seren versetzt wurden, zeigten geringfügige Signaländerungen im Vergleich zum versetzten Serum desselben Spenders. Insbesondere die OD<sub>450</sub>-Werte mit versetzten EDTA-, Citrat- und Heparinplasmen betragen 79% bis 128% des versetzten Serums (15 Proben mit Serumkonzentrationen im Bereich von 2,6 U/mL bis 30 U/mL) bzw. 87% bis 130% in U/mL. Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen und vorsichtig mischen, um Homogenität zu gewährleisten. Zentrifugieren Sie das Serum vor dem Test (vorzugsweise 5 Minuten bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Feststoffe zu entfernen. Bitte lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt nicht aus, wenn die Seren trüb sind oder Partikel enthalten.

## Kitbestandteile

1. **MPL** Mikrotiterplatte mit AQP4 beschichtet (96 Wells gesamt, 8 Wells pro Streifen). Vor dem Öffnen der Packung sollte diese für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) lagern. Nicht benötigte Wells in die originale Folienverpackung zurückgeben, zukleben, in das Säckchen mit dem

Trockenmittel geben und gut verschließen. Aufbewahren bei 2-8°C und innerhalb von 4 Monaten verbrauchen.

2. **CAL 1** – **CAL 5** Kalibratoren je 0,7 mL; gebrauchsfertig; 1,5; 5; 20; 40; 80 U/mL (arbiträre IASON Einheiten); genaue Konzentrationen siehe Fläschchen.
3. **CO 1** und **CO 2** Positive Kontrollen; je 0,7 mL, gebrauchsfertig; Konzentration siehe QC Zertifikat.
4. **NC** Negative Kontrolle; 0,7 mL; gebrauchsfertig.
5. **WASH** Konzentrierte Waschlösung; 120 mL; 1:10 verdünnen mit aqua dest. ; bei 2 – 8°C haltbar bis zum Ablaufdatum.
6. **BIOBU** AQP4 Biotin Rekonstitutionspuffer; 1 x 10 mL; zum rekonstituieren von **BIO**.
7. **BIO** AQP4 Biotin; 3 Fläschchen; lyophilisiert; erst kurz vor dem Gebrauch rekonstituieren mit je 1,5 mL **BIOBU**.
8. **PODBU** Diluent für **SAPOD**; 15 mL; gebrauchsfertig.
9. **SAPOD** Streptavidin Peroxidase; 0,8 mL; 20 x mit **PODBU** verdünnen; z.B. 0,5 mL **SAPOD** mit 9,5 mL **PODBU**; nach der Verdünnung bis zu 16 Wochen haltbar bei 2 – 8°C.
10. **SUB** Substrat; 15 mL; TMB; gebrauchsfertig.
11. **STOP** Stopplösung; 14 mL; gebrauchsfertig.

### **Erforderliches Zubehör**

- Pipetten mit einer Kapazität von 25 µL, 50 µL und 100 µL
- Mittel zum Messen verschiedener Volumina zum Wiederherstellen oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien
- Reines Wasser
- ELISA-Plattenleser für 96-Well-Formate und für Messungen bei 450 nm und 405 nm
- ELISA Plate Shaker mit 500 Shakes/min (kein Orbital-Shaker)
- ELISA-Plattenabdeckung

### **Testdurchführung**

#### **Allgemeine Informationen**

1. Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
2. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
3. Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

4. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
5. Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.

### **Testdurchführung**

*Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.*

Alle **CAL**, **CO** und Proben sollten in zweifacher Ausfertigung gleichzeitig ausgeführt werden, so dass die Bedingungen für alle gleich sind.

1. 50 µL **NC**, **CAL 1** – **CAL 5**, **CO 1** **CO2**, und Patientenproben pipettieren (Doppelbestimmung). Eine Vertiefung für den Blank freilassen.
2. 25 µL **BIO** pipettieren (außer Blank).
3. Die zugeklebte Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.) inkubieren.
4. Nach der Inkubation die ELISA Platte 3x waschen. Die Flüssigkeit absaugen oder dekantieren. 300 µL verdünnte **WASH** pipettieren. Den Vorgang weitere 2x wiederholen. Die Waschlösung absaugen oder dekantieren. Die ELISA Platte auf Zellstoff gut ausklopfen (nicht notwendig, wenn ein automatischer Plattenwäscher verwendet wird).
5. 100 µL verdünnter **SAPOD** vorsichtig pipettieren (außer Blank).
6. Die zugeklebte Platte 20 min bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (500 Bewegungen per Min.) inkubieren.
7. 3x mit verdünntem **WASH** wie in Punkt 4. beschrieben waschen. Wenn manuell gewaschen wird, führen Sie einen zusätzlichen Waschschrift mit destilliertem Wasser durch, um den Schaum zu entfernen bevor die ELISA Platte auf Zellstoff ausklopft wird.
8. 100 µL **SUB** vorsichtig pipettieren (inkl. Blank).
9. Inkubation 20 min bei Raumtemperatur (20-25°C) ohne Schütteln im Dunkeln.
10. Die Farbentwicklung wird durch vorsichtige Zugabe von 100 µL **STOP** unterbrochen (inkl. Blank). (die Zugabe der Stopplösung bewirkt einen Farbumschlag von blau auf gelb). Die Platte anschließend ca. 5 Sek. schütteln. Es ist sehr wichtig sicherzustellen, dass die Substratinkubationszeit (d.h. die Zeit von der Zugabe des Substrats bis zur Zugabe der Stopplösung) für jedes Well gleich lang ist.
1. Die Absorption der Wells wird bei einer Wellenlänge von 450 nm - optional 405 nm - (Referenzfilter 620 – 650 nm) mittels Mikrotiterplattenphotometer innerhalb von 10 Minuten nach dem Hinzufügen der **STOP** gemessen. Blank-Wert abziehen.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**

## Ergebnisberechnung

- Eine Standardkurve anlegen, indem man die Werte der Absorption eines jeden Standards gegen die Konzentration aufträgt. So können die Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden.
- Alternative Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. 4PL (4 Parameter Logistik) oder Point-to-Point – Auswertung werden empfohlen. Die **NC** hat eine Konzentration von 0 U/mL, jedoch kann ein Wert von 0,15 U/mL zur Erleichterung der elektronischen Datenverarbeitung zugewiesen werden.
- Proben mit AQP4 Antikörper Konzentrationen über 80 U/mL können mit AQP Antikörper negativem Serum verdünnt werden (1/10 bzw. 1/100). Vereinzelt Seren können ein nicht lineares Verdünnungsmuster aufweisen.

## Assay Beispieldaten

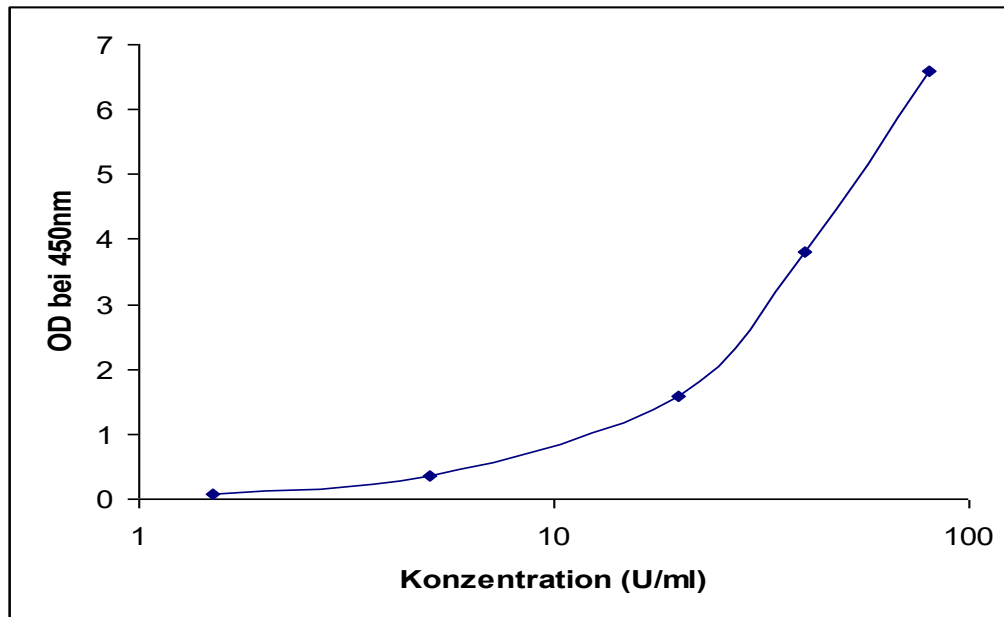
Typische Ergebnisse der EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kalibratoren:

Kalibratoren	Absorption	
	450 nm	405 nm
U/mL		
1,5	0,085	0,024
5	0,354	0,108
20	1,577	0,468
40	3,802	1,118
80	6,588	1,938

Diese Daten sind nur für Illustration und sind nicht für die Berechnung der Probenergebnisse zu verwenden.

Absorptionswerte bei 405 nm können in 450 nm Absorptionswerte durch Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor umgewandelt werden (3,0 im Falle von IASON Instrumenten).

## Typische Eichkurve



Diese Eichkurve dient nur als Illustrationsbeispiel.

### Erwartete Werte

	U/mL
Negativ	<3
Positiv	≥3

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Die Ergebnisse sollten mit anderen klinischen Befunden und Observationen korrelieren.

### Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den



angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

## **Test Charakteristika**

### ***Spezifität***

Proben von 358 individuellen, gesunden Blutspendern wurden mit dem EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 gemessen. Alle 356 Proben (99%) wurden negativ auf AQP4 Autoantikörper getestet.

### ***Sensitivität***

Bei Proben von 62 Patienten mit NMO oder NMO Spektrum Disorder (NMOSD) wurden 48 (77%) mit dem EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 positiv gemessen.

### ***Detektionslimit***

NC wurde 20-fach bestimmt. Mittelwert und Standardabweichung wurden bestimmt. Das Detektionslimit bei 2 Standardabweichungen beträgt 0,17 U/mL.

## **Grenzen des Tests**

Als Voraussetzung für zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse soll das Assayverfahren erst nach vollständigem Durchlesen und Verstehen der Packungsbeilagen und in Befolgung guter Laborpraktiken durchgeführt werden.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### ***Interferenzen***

Es konnten keine Interferenzen für nachfolgende aufgelistete Substanzen festgestellt werden:

- Bilirubin bis 20 mg/dL
- Intralipid bis 3000 mg/dL

Bei 500mg/dL Hämoglobin konnten Interferenzen erkannt werden.

Inter-Assay-Präzision (n=20)			Intra-Assay-Präzision (n=25)		
Probe	Konzentration [U/mL]	VK [%]	Probe	Konzentration [U/mL]	VK [%]
1	5,0	15,6	1	3,9	7,7
2	13,3	10,5	2	7,0	8,6
3	35	7,9	3	28	3,2
4	59	7,5	4	58	3,1

## Literatur

1. V.A. Lennon et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004 364(9451): 2106-2112
2. V.A. Lennon et al. IgG Marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The journey of Experimental Medicine* 2005 202: 473 – 477
3. B.G. Weinshenker et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Annals of Neurology* 2006 59: 566 – 569
4. N. Isobe et al. Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal* 2012 18: 1541 – 1551
5. S. Jarius et al. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: Sensitivity, specificity and direct comparison with immunohistochemistry. *Journal of the Neurological Sciences* 2012 320: 32 – 37

## Patente:

Europäisches Patent EP 1 700 120 B1, US Patente US 7,101,679 B2, US 7,947,254 B2 and US 8,889,102 B2, Chinesisches Patent ZL200480040851.3 und Japanisches Patent 4538464 finden eine Anwendung.



## Arbeitsschema

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.

1. Pipettieren	CAL1 – CAL5 50µL	NC 50µL	CO1 – CO2 50µL	Proben 50µL
2. Pipettieren	BIO	(außer Blank)		25µL
3. Inkubieren	Platte abdecken 2 Std. bei Raumtemperatur (20-25°C) schütteln (500 Bewegungen per Min.)			
4. Waschen	3 x waschen: Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL verdünntes WASH pipettieren Waschlösung absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen*			
5. Pipettieren	SAPOD	(außer Blank)		100µL
6. Inkubieren	Platte abdecken 20 min bei Raumtemperatur (20-25°C) schütteln (500 Bewegungen per Min.)			
7. Waschen	3 x waschen: siehe Punkt 4			
8. Pipettieren	SUB	(inkl. Blank)		100µL
9. Inkubieren	20 min. bei Raumtemperatur (20-25°C) <b>im Dunkeln</b>			
10. Pipettieren	STOP	(inkl. Blank)		100µL anschließend 5 sec schütteln
11. Messen	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Faktor 3 (Photometer abhängig), messen innerhalb 10 min. Auswertung: 4-Parameter oder Point To Point.			

Details siehe Punkt Testdurchführung.

### Erwartete Werte

	U/mL
Negativ	<3
Positiv	≥3



# EIASON® Aquaporin-4 Ab V2



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of autoantibodies against  
AQP4 in human serum

## Instruction for use

For in-vitro-diagnostic use only

Product of



**IASON** GmbH

Feldkirchner Straße 4

A – 8054 Graz-Seiersberg

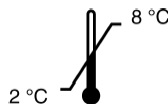
Tel.: +43 (0)316 28 43 00

Fax: +43 (0)316 28 43 00-113










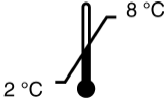










Email: [office@iason.eu](mailto:office@iason.eu)

[www.iason.eu](http://www.iason.eu)

REF E07-050-96-2



## Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Positive Controls
	Order number		Negative Control
	Product of		Biotin
	Expiry date		Buffer for reconstitution of 
	Storage		Streptavidin Peroxidase
	European Conformity		Diluent for 
	Batch code		Concentrated Wash Solution
	Microplate		Substrate
	Calibrators		Stop solution

## Intended use

*For in-vitro-diagnostic use only.*

The EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 kit is an enzymeimmunoassay intended for use by professional persons only, for the quantitative determination of autoantibodies against AQP4 in human serum. Neuromyelitis optica (NMO), also known as Devic's syndrome, is an immune-mediated neurologic disease that involves the spinal cord

and optic nerves. It can be considered to be a disorder distinct from multiple sclerosis (MS). A serum immunoglobulin G autoantibody (NMO-IgG) has been shown to be a specific marker for NMO and the water channel aquaporin 4 (AQP4) has been identified as the antigen for NMO IgG. Measurement of AQP4 autoantibodies can be of considerable value in distinguishing NMO from MS when full clinical features may not be apparent and early intervention may prevent or delay disability.

### **Assay principle**

In the EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit, AQP4 antibodies in patients' sera, calibrators and controls are allowed to interact with AQP4 coated onto ELISA plate wells and liquid phase biotinylated AQP4. After incubation at room temperature for 2 hours with shaking, the well contents are discarded. AQP4 Ab bound to the AQP4 coated on the well will also interact with AQP4-Biotin through the ability of AQP4 Ab in the samples to act divalently leaving AQP4-Biotin bound to the well via an AQP4 Ab bridge. The amount of AQP4-Biotin bound is then determined in a second incubation step involving addition of streptavidin peroxidase (SA-POD), which binds specifically to biotin. Excess, unbound streptavidin peroxidase is then washed away and addition of the peroxidase substrate, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB), results in formation of a blue colour. This reaction is stopped by the addition of a stop solution, causing the well contents to turn yellow. The absorbance of the yellow reaction mixture at 450nm and 405nm is then read using an ELISA plate reader. A higher absorbance indicates the presence of AQP4 autoantibody in the test sample. Reading at 405nm allows quantitation of high absorbances. It is recommended that values below 10 U/mL should be measured at 450nm. If it is possible to read at only one wavelength 405nm may be used. The measuring range is 3 – 80 U/mL (arbitrary IASON units).

### **Warnings and precautions**

The EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON GmbH will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

**CAUTION:** this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

## Safety considerations

SAPOD



**Signal word:** Warning

**Hazard statement(s):**

H317: May cause an allergic skin reaction

**Precautionary statement(s):**

P280: Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face protection.

P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P333 + P313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362 + P364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse

## Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C. Do not use reagents beyond this date.

## Storage and preparation of serum samples

Sera to be analyzed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below –20°C. 100 µL is sufficient for one assay (duplicate 50 µL determinations). Repeated freeze thawing or increases in storage temperature should be avoided. Do not use lipaemic or haemolysed samples. Studies in which EDTA, citrate and heparin plasma samples were spiked with AQP4 Ab positive sera showed minor changes in signal compared with spiked serum from the same donor. In particular OD<sub>450</sub> values with spiked EDTA, citrate and heparin plasmas were 79% - 128% of spiked serum (15 samples with serum concentrations ranging from 2.6 U/mL – 30 U/mL) or 87% - 130% in terms of U/mL.

When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge serum prior to assay (preferably for 5 min at 10 - 15,000 rpm in a microfuge) to remove particulate matter. Please do not omit this centrifugation step if sera are cloudy or contain particulates.

## Materials provided

1. **MPL** Microplate with wells coated with AQP4 (96 wells in total, 8 wells per strip). Before opening the packet of strip wells, allow it to stand at room temperature (20-25°C) for at least 30 minutes. After opening, keep any unused wells in the original foil packet (reseal with adhesive tape) and in the self-seal plastic bag with the desiccant provided. Store at 2-8°C and use within 4 months. A frame for holding the wells during assays is also provided.
2. **CAL 1** - **CAL 5** Calibrators; 0.7 mL each; ready to use; 1.5; 5; 20; 40; 80 U/mL, arbitrary IASON units.



3. **CO1** **CO2** Positive Controls; 0.7 mL each; ready to use. Refer to package insert for concentration.
4. **NC** Negative Control; 0.7 mL; ready to use.
5. **WASH** Concentrated wash solution; 120 mL; 10 x concentrated; dilute 1: 10 with distilled water before use; store at 2 – 8°C up to kit expiry date.
6. **BIOBU** AQP4 Biotin reconstitution buffer for reconstituting **BIO**; 1 x 10 mL; ready to use.
7. **BIO** AQP4 Biotin; 3 vials; lyophilised; reconstitute immediately before use each vial with 1.5 mL of **BIOBU**; when more than one vial is to be used, pool the vials and mix gently before use.
8. **PODBU** Diluent for diluting **SAPOD**; 15 mL; ready to use.
9. **SAPOD** Streptavidin Peroxidase; 0.8 mL; to be diluted 1: 20 with **PODBU** (e.g. 0.5 mL + 9.5 mL). Store at 2-8°C for up to 4 months after reconstitution.
10. **SUB** Peroxidase substrate; Tetramethyl benzidine; TMB; 15 mL ready to use.
11. **STOP** Stop solution; 14 ml; ready to use.

### Materials required but not provided in the kit

- Pipettes capable of dispensing 25 µL, 50 µL and 100 µL.
- Means of measuring out various volumes to reconstitute or dilute reagents.
- Pure water.
- ELISA Plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450 nm and 405 nm.
- ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).
- ELISA Plate cover.

### Assay procedure

#### General remarks

1. All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
3. Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
4. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
5. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
6. Each assay run must include a standard curve and controls.

### Test procedure

Allow all reagents to reach room temperature (20-25°C) before use.

All **CAL**, **CO** and samples, and should be run in duplicate and should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

1. Pipette 50 µL of **CAL 1** - **CAL5**, **NC**, **CO1** **CO2** and test sera into the wells (in duplicate). Leave one well empty for blank.
2. Pipette 25 µL of **BIO** into each well (except blank).
3. Cover the frame and shake the wells for 2 hours at room temperature (20 -25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
4. After the incubation, discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 300 µL diluted **WASH** per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
5. Pipette carefully 100 µL of **SAPOD** into each well (except blank).
6. Cover the plate and incubate for 20 min at room temperature (20-25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
7. Repeat wash step 4.
8. Pipette carefully 100 µL of **SUB** into each well (including blank).
9. Incubate for 20 min in the dark at room temperature (20-25°C) without shaking.
10. Stop the substrate reaction by careful addition of 100 µl of **STOP** to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. It is most important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of substrate to addition of stop solution) is the same for each well.
11. Measure the absorbance of each well at 450 nm and 405 nm for overrange filter (reference 620 – 650 nm) within 10 minutes after adding the **STOP**. Subtract the blank value.

or fully automated on:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**

### Calculation of results

A calibration curve can be established by plotting calibrator concentration on the x-axis (log scale) against the absorbance of the calibrators on the y-axis (linear scale). The AQP4 autoantibody concentrations in patient sera can then be read off the calibration curve. Other data reduction systems can be used. The **NC** can be assigned a value of 0.15 U/mL to assist in computer processing of assay results. Samples with AQP4 autoantibody concentrations above 80 U/mL can be diluted (e.g.

10 x and/or 100 x) in AQP4 antibody negative serum. Some sera will not dilute in a linear way.

**Sample assay data**

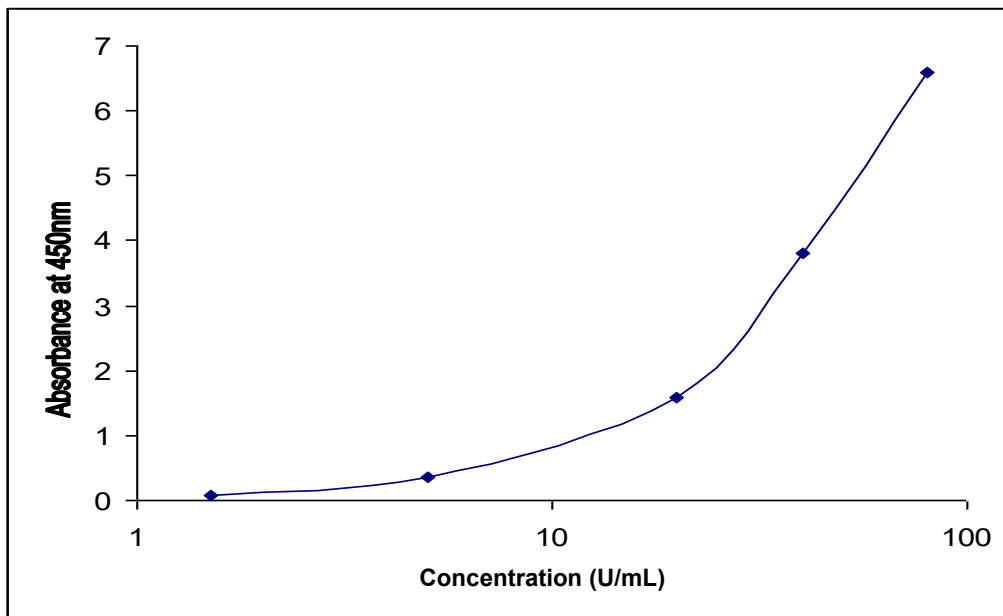
Typical results obtained with EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 calibrators:

Calibrators U/mL	Absorbance	
	450 nm	405 nm
1.5	0.085	0.024
5	0.354	0.108
20	1.577	0.468
40	3.802	1.118
80	6.588	1.938

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Absorbance readings at 450 nm can be converted to 405 nm absorbances by multiplying by the appropriate factor (3.0 in the case of IASON instruments).

**Typical calibration curve**



This sample calibration curve is for illustration only.

### Expected Values

	U/mL
Negative	<3
Positive	≥3

Each laboratory is recommended to determine ranges for their local population. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

### Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

### Test characteristics

#### *Clinical specificity*

Sera from 358 individual healthy blood donors were tested in the EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit. 356 (99%) sera were identified as being negative for AQP4 Ab

#### *Clinical sensitivity*

Of 62 sera from patients with NMO or NMO spectrum disorder (NMOSD) 48 (77%) were positive for AQP4 Ab.

**Lower detection limit**

The **NC** was assayed 20 times and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at 2 standard deviations was 0.17 U/mL.

**Precision**

Inter-assay-precision (n=20)			Intra-assay-precision (n=25)		
Sample	Concentration [U/mL]	CV [%]	Sample	Concentration [U/mL]	CV [%]
1	5.0	15.6	1	3.9	7.7
2	13.3	10.5	2	7.0	8.6
3	35	7.9	3	28	3.2
4	59	7.5	4	58	3.1

**Clinical accuracy**

Analysis of 205 sera from patients with autoimmune diseases other than neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) indicated no interference from autoantibodies to the TSH receptor (n=110), glutamic acid decarboxylase (n=26), 21-hydroxylase (n=12), the acetylcholine receptor (n=10), thyroid peroxidase (n=15), thyroglobulin (n=10), IA-2 (n=7) or from rheumatoid factor (n=15) in the EIASON® Aquaporin-4 Ab V2 Kit.

**Limitation of use**

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

**Interference**

No interference was observed when samples were spiked with the following materials:

- Intralipid at 1000 and 3000 mg/dL
- Bilirubin up to 20 mg/dL

Interference was seen from haemoglobin at 500 mg/dL.

## **Legal aspects**

### ***Reliability of results***

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON GmbH.

### ***Therapeutic consequences***

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### ***Liability***

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## Literature

1. V.A. Lennon et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004 364(9451): 2106-2112
2. V.A. Lennon et al. IgG Marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The journey of Experimental Medicine* 2005 202: 473 – 477
3. B.G. Weinshenker et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Annals of Neurology* 2006 59: 566 - 569
4. N. Isobe et al. Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal* 2012 18: 1541 – 1551
5. S. Jarius et al. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: Sensitivity, specificity and direct comparison with immunohistochemistry. *Journal of the Neurological Sciences* 2012 320: 32 – 37

## Patents

The following patents apply:

European patent EP 1 700 120 B1, US patents US 7,101,679 B2, US 7,947,254 B2 and US 8,889,102 B2 , Chinese patent ZL200480040851.3 and Japanese patent 4538464.

## Pipetting scheme

Allow all reagents and sample to reach room temperature (20 – 25°C) before use.

1. Pipetting	CAL1 – CAL5 50µL	NC 50µL	CO1 – CO2 50µL	Samples 50µL
2. Pipetting	BIO	(except blank)		25µL
3. Incubation	Cover plate 2 hours at room temperature (20-25°C) with shaking (500 shakes per min)			
4. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300µL of diluted WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material*			
5. Pipetting	SAPOD	(except blank)		100µL
6. Incubation	Cover plate 20 min at room temperature (20-25°C) with shaking (500 shakes per min)			
7. Washing	see point 4. *			
8. Pipetting	SUB	(including blank)		100µL
9. Incubation	20 min at room temperature (20-25°C) <b>in the dark</b> without shaking			
10. Pipetting	STOP	(including blank)		100µL
11. Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 10 min. Calculation: 4-parameter or point to point			

For details, see point assay procedure

### Expected values

	U/mL
Negative	<3
Positive	≥3