



EIASON[®] Anti Cardiolipin Screen



Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of IgG, IgM and IgA class autoantibodies against cardiolipin in human serum or plasma

Kit instruction

For in-vitro use only

Product of



IASON GmbH

Feldkirchner Straße 4

A – 8054 Graz-Seiersberg

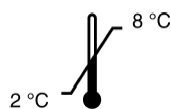
Tel.: +43 (0)316 28 43 00

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







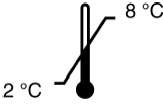







Email: office@iason.eu

www.iason.eu

REF E07-061-96



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Sample buffer
	Order number		Enzym conjugate concentrate
	Product of		Concentrated wash solution
	Storage		Batch code
	European Conformity		Substrate
	Expiry date		Stop Solution
	Calibrators		Microplate

Intended Use

For in-vitro use only.

The EIASON® Anti Cardiolipin Screen kit is an enzymeimmunoassay intended for the simultaneous quantitative determination of IgG, IgM and IgA autoantibodies against cardiolipin in human serum or plasma.

Summary

Antiphospholipid syndrome (APS, Hughes Syndrome) is a systemic autoimmune disease that causes thromboses, recurrent miscarriage or stillbirths, and stroke. Clinical symptoms are accompanied by specific autoantibodies in the blood, which bind to phospholipids like cardiolipin, or phospholipid-binding proteins like beta-2-glycoprotein I. Autoantibodies against proteins of the coagulation cascade, e.g. prothrombin or annexin V may also be found in patients with APS with otherwise negative phospholipid antibody results. In primary APS autoantibodies against

phospholipids appear independently, while in secondary APS phospholipid antibodies are detected in conjunction with other autoimmune diseases, such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, or Sjögren's syndrome.

Assay principle

Highly purified cardiolipin is coated on microwells saturated with β -2-glycoprotein I. The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps:

Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product.

The intensity of the yellow colour correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

Warnings and Precautions

The EIASON® Anti Cardiolipin Screen 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 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.

Damaged test kit

In case of serious damage to the test kit or components, the company IASON must be notified in writing at least one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for the test run. They have to be stored until a final solution has been found.

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 expose tests reagents to heat, sun or strong light during storage and usage. Diluted sample buffer and wash buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C, but consumption on the same day is recommended.

Storage and preparation of serum samples

Specimens to be analysed should be assayed soon after separation, refrigerated at 2-8°C for up to 5 days or stored, preferably in aliquots, at or below -20°C up to six months. Repeated freezing and thawing or increases in storage temperature must be avoided. Incorrect storage of serum or plasma samples can lead to loss of autoantibody activity.

Do not use lipaemic or grossly haemolysed serum samples.

When required, thaw test sera or plasma at room temperature and mix gently to ensure homogeneity.

Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Materials provided

Allow all reagents 1-7 to reach room temperature (20-25°C) before use.

1. **MPL** Divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells. Ready to use.
2. **CAL A** - **CAL D** ready to use, 1.5 mL each, containing cardiolipin antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%). Ready to use.
CAL A “-“ 3.3 U/mL = Negative Control, **CAL B** “+/-“ 10 U/mL = Cut Off Control, **CAL C** “+“ 30 U/mL = Positive Control, **CAL D** “++“ 90 U/mL = Strong Positive Control.
3. **BU** Sample buffer, 1 vial, 20 mL, (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow, concentrate 5 x, dilute the vial with distilled water to a final volume of 100 mL prior to use. Stable at 2-8°C for at least 30 days after preparation or until the expiration date printed on the label.
4. **CONJ** Enzyme Conjugate solution 1 vial 15 mL (PBS, BSA, detergent, Proclin <0.05%), light red, anti-human IgG, anti-human IgM and anti-human IgA antibodies, labelled with horseradish peroxidase, ready to use.
5. **SUB** Peroxidase substrate (tetramethyl benzidine; TMB; 15 mL ready to use).
6. **STOP** Stop solution (contains acid; 15 mL ready to use).
7. **WASH** wash solution (TRIS, detergent, NaN₃ 0.09%), concentrate 50 x. Dilute the vial with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. Stable at 2-8°C for at least 30 days after preparation or until the expiration date printed on the label.
8. 1 Instruction for use
9. 1 Certificate of analysis

Materials required but not provided in the kit:

- Pipettes capable of dispensing 10, 100 and 1000 µL
- Vortex Mixer
- Distilled water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring absorbances at 450 nm and optional 620 nm

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

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. **CAL A** - **CAL D** ready to use, 1.5 mL each, containing cardiolipin antibodies in a Dilute all samples 1:100 with diluted **BU** before assay. Therefore combine 10 µL of sample with 990 µL of **BU** in a polystyrene tube. Mix well.
2. Pipette 100 µL of **CAL A** - **CAL D** and diluted patient samples into the wells (in duplicate recommended).
3. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
4. Discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 300 µL of 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 **CONJ** into each well.
6. Incubate for 15 minutes at room temperature (20-25°C).
7. Discard the **CONJ** by briskly inverting the wells over a suitable receptacle, wash 3 times with diluted **WASH** as described under point 4.
8. Pipette carefully 100 µL of **SUB** into each well.
9. Incubate for 15 minutes at room temperature (20-25°C).
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 **SUB** to addition of **STOP**) is the same for each well.

11. Incubate for 5 minutes at room temperature
12. Measure the absorbance of each well at 450 nm and optional at 405 nm for overrange filter (reference 620 – 650 nm) within 30 minutes after end of incubation before.
or fully automated on:

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

Calulation of results

For quantitative calculation plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve by interpolation. Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

Expected values

Negative	< 10 U/mL
Positive	≥ 10 U/mL

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

Calibration

The assay system is calibrated against the internationally recognised reference sera from E.N. Harris, Louisville and the specific reference material IRP 97/656 (IgG) and HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Measuring range

The calculation range of EIASON® Anti Cardiolipin Screen is 0-90 U/mL.

Expected values

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the EIASON® Anti Cardiolipin Screen kit:

Cut-Off: 10 U/mL

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in diluted **BU** to demonstrate the dynamic range of the assay and the lower/upper end of linearity. Activity of each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution	Observed [U/mL]	Expected [U/mL]	O/E [%]
1	1:100	91.0	91.0	100
	1:200	47.7	45.5	105
	1:400	24.0	22.8	105
	1:800	11.5	11.4	101
	1:1600	6.0	5.7	105
2	1:100	69.1	69.1	100
	1:200	33.5	34.6	97
	1:400	15.9	17.3	92
	1:800	7.8	8.6	91
	1:1600	4.1	4.3	95

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be: 1 U/mL

ReproducibilityIntra-assay precision:

Precision-within-assay was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Intra-Assay		
Sample No	Mean [U/mL]	CV [%]
1	5.8	12.4
2	15.8	8.1
3	43.7	4.7
4	75.9	2.5

Inter-assay precision:

Run-to-run precision was calculated for each of three samples from the results of 6 different determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Inter-Assay		
Sample No	Mean [U/mL]	CV [%]
1	4.5	13.3
2	14.8	5.2
3	42.1	4.1
4	70.2	6.6

Interferences

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL), lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera or plasma.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, heparin).

However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Study results

Study population	n	n Pos IgG	[%]
Primary APS	8	8	100
Secondary APS	65	61	93.8
Normal human sera	150	8	5.3

EIASON® Anti Cardiolipin Screen		Clinical diagnosis		
		Positive	Negative	
	Positive	69	8	
	Negative	4	142	
	Sum	73	150	223

Sensitivity 94.5 %

Specificity 94.7 %

Overall agreement 94.6 %

Limitation of use

The EIASON® Anti Cardiolipin Screen kit is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision about therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendation only. Each laboratory should establish its own range according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

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.

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. Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De F, V, Ruffatti A, Bison E et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res* 2011; 128(6):583-6.
2. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de LB, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):191-205.
3. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13(1):70-6.
4. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies- from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(4):192-9.
5. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7(11):1767-73.
6. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):230.
7. Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3):447-61.
8. Fischer MJ, Rauch J, Levine JS. The antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 27(1):35-46.
9. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113(5):985-94.
10. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109(4):704-15.
11. Hughes GR. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32(3):260-4.
12. Hughes GR. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome): ten clinical lessons. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):262-6.
13. Hughes GR. Antiphospholipid syndrome, migraine and stroke. *Lupus* 2010; 19(5):555-6.
14. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3):486-9.
15. Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3):129-33.
16. Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1):1-10.

17. Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev* 2006; 5(1):70-5.
18. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
19. Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De CC et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(2):291-6.
20. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(4):335-9.
21. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120(1):127-33.
22. Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G et al. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):182-90.
23. Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2):358-60.
24. Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol JID - 9012268* 2002; 15 Suppl 6:S20-S27.
25. Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010; 19(4):432-5.
26. Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2):268-74.
27. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309-11.
28. Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, Baumgart K, Bird R, Brighton TA et al. Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 2008; 40(1):58-63.
29. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36(1):63-8.

Pipetting scheme

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

1. Dilution	Samples 1:100 with diluted BU
2. Pipetting	CAL A – CAL D diluted samples 100 µL
3. Incubation	30 min at room temperature (20-25°C)
4. Washing	wash 3 x : aspirate or decant add 300 µL diluted WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material
5. Pipetting	CONJ 100µL
6. Incubation	15 min at room temperature (20-25°C)
7. Washing	wash 3 x : see step 4
8. Pipetting	SUB 100µL
9. Incubation	15 minutes at room temperature (20-25°C)
10. Pipetting	STOP 100µL
11. Incubation	5 min at room temperature (20-25°C)
12. Reading	450nm (RF 620nm) Optional Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 30 min. Calculation: 4-parameter

Expected Values

Negative	< 10 U/mL
Positive	≥ 10 U/mL



EIASON® Anti Cardiolipin Screen



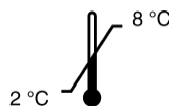
Enzyme Immunassay für die quantitative Bestimmung von IgG-, IgA und IgM-
Antikörpern gegen Cardiolipin in humanem Serum oder Plasma

Anleitung







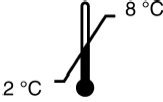







Nur für in-vitro Gebrauch

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
www.iason.eu



Nützliche IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Probenpuffer
	Bestellnummer		Enzymkonjugat Konzentrat
	Hergestellt von		Waschpuffer Konzentrat
	Lagerung bei		Chargenbezeichnung
	Europäische Konformität		Substrat
	Verwendbar bis		Stopplösung
	Standards		Mikrotiterplatte

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® Anti Cardiolipin Screen Kit ist ein Testsystem für die quantitative Bestimmung von IgG-, IgA und IgM-Antikörpern gegen Cardiolipin in humanem Serum oder Plasma.

Zusammenfassung

Das Anti-Phospholipid-Syndrom (APS, Hughes Syndrom) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die Thrombosen, habituelle Aborte, Totgeburten oder Schlaganfälle verursachen kann. Neben klinischen Symptomen können spezifische Autoantikörper im Blut auftreten. Diese binden an Phospholipide, wie Cardiolipin, oder Phospholipid-bindende Proteine, wie beta-2-Glycoprotein. Autoantikörper gegen Proteine der Blutgerinnungskaskade oder Komplexe dieser Proteine mit Phospholipiden kommen ebenfalls vor. Antikörper gegen Prothrombin oder Annexin V können auch bei APS-Patienten mit ansonsten negativem Phospholipidantikörperbefund nachweisbar sein. Beim primären APS treten Phospholipidantikörper unabhängig von anderen Erkrankungen auf, beim

sekundären APS sind sie mit anderen Autoimmunerkrankheiten vergesellschaftet, wie SLE, rheumatoide Arthritis oder Sjögren Syndrom.

Messprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind beschichtet mit Cardiolipin gesättigt mit beta-2-Glycoprotein I. Die Bestimmung basiert auf dem Prinzip eines indirekten ELISA mit den folgenden Schritten:

Spezifische Antikörper, die in der zu untersuchenden Probe enthalten sind, binden an die Antigene, mit denen die Oberflächen der Reaktionskavitäten beschichtet sind. Ein auf die anschließende Inkubation folgender Waschschrift entfernt alle nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Moleküle. Das zugegebene Enzymkonjugat bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Inkubation wird in einem zweiten Waschschrift überschüssiges Konjugat entfernt. Das Enzymkonjugat setzt zugefügtes Substrat in ein blaugefärbtes Produkt um.

Durch Zugabe von Säure entsteht ein gelbgefärbtes Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert mit der Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplexen und wird über ein optisches Modul bei 450 nm gemessen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® Anti Cardiolipin Screen 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 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. Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt, auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. 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.

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 Verfallsdatum stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern. Reagenzien während der Lagerung und Anwendung nicht Hitze, Sonne oder starkem Licht aussetzen.

Mikrotiterplatte versiegelt und mit Trockenmittel versehen im mitgelieferten Klippbeutel lagern. Verdünnter Waschpuffer und verdünnter Probenpuffer sind bei

2 °C – 8 °C mindestens 30 Tage stabil. Es ist jedoch empfohlen, die Gebrauchslösungen am selben Tag zu verbrauchen.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Die Proben nach der Abnahme können gekühlt bei 2 °C – 8 °C bis zu 5 Tage aufbewahrt werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten sie aliquotiert bei bzw. unter –20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Falsche Lagerung der Patientenproben kann zum Verlust der Autoantikörper Aktivität führen.

Keine lipämische und stark hämolytische Patientenproben verwenden.

Wenn erforderlich, die Patientenproben bei Raumtemperatur auftauen lassen und gut vortexen. Serum sollte vor dem Test noch einmal zentrifugiert werden, um eventuell vorhandene Partikel zu entfernen. (5 min bei 10 000-15 000 x g). Die Verwendung von hitzeinaktivierter Seren wird nicht empfohlen

Kitbestandteile

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

1. **MPL** Eine Mikrotiterplatte mit 12 Modulen mit jeweils 8 Kavitäten. Gebrauchsfertig.
2. **CAL A** – **CAL D** 1,5 mL enthält Cardiolipin-Antikörper in Serum/Puffer-Matrix (PBS, BSA, Detergens, NaN₃ 0,09%). Gebrauchsfertig. **CAL A** “-“ 3,3 U/mL = Negative Kontrolle, **CAL B** “+/-“ 10 U/mL = Cut Off Kontrolle **CAL C** “+“ 30 U/mL = Positive Kontrolle, **CAL D** ++ 90 U/mL =Hoch Positive Kontrolle.
3. **BU** Probenpuffer; gelb; enthält PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel NaN₃ 0,09%. Konzentrat 5x. Bis zu einem Endvolumen von 100 mL verdünnen. Bei 2-8°C bis zu 30 Tage nach der Verdünnung stabil oder unverdünnt bis zum Ablaufdatum.
4. **CONJ** Enzymkonjugat; enthält anti-human IgG-, IgA- und IgM-Antikörper, POD markiert, in PBS, BSA, Detergens, Konservierungsmittel Proclin <0,05%, rosa. Gebrauchsfertig.
5. **SUB** TMB-Substrat; 15mL; enthält 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.
6. **STOP** Stopplösung; 15mL; enthält Säure. Gebrauchsfertig
7. **WASH** Waschlösung (TRIS, NaN₃ 0,09%), 50 x konzentriert. Auf ein Volumen von 1000mL verdünnen. Bei 2-8°C bis zu 30 Tage nach der Verdünnung stabil oder unverdünnt bis zum Ablaufdatum.

1 Gebrauchsanweisung

1 Qualitätskontrollzertifikat

Erforderliches Zubehör

- Pipetten für 10, 100 und 1000 µL
- Destilliertes Wasser
- Vortex Mixer
- ELISA Photometer (450 nm und 620 nm – optional 405 nm)

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

1. Patientenproben 1:100 verdünnen: 990 µL verdünnten **BU** im Polystyrolröhrchen vorlegen und 10 µL Probe zugeben. Mischen.
2. Jeweils 100 µL der Standards, Kontrollen und vorverdünnten Patientenproben in die Kavitäten pipettieren.
3. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
4. Kavitäten entleeren und 3-mal, mit jeweils 300 µL verdünntem **WASH**, waschen. Gut ausklopfen.
5. Jeweils 100 µL Enzymkonjugat in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettieren.
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.
7. Kavitäten entleeren und 3-mal, mit jeweils 300 µL Waschpuffer, waschen. Gut ausklopfen.
8. Jeweils 100 µL TMB-Substrat in die Kavitäten pipettieren.
9. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren.

10. Jeweils 100 µL Stopplösung in jede Kavität dazu pipettieren. Die Platte für ca. 5 Sekunden auf einem Schüttler schütteln.
11. 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 28 °C) inkubieren
12. Optische Dichte bei 450 nm (Referenz 600-690 nm) messen und die Ergebnisse berechnen. Die Farbentwicklung ist mindestens 30 Minuten stabil. Innerhalb dieser Zeit optische Dichte messen.

oder vollautomatisiert auf:

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

Ergebnisberechnung

Für quantitative Resultate erstellt man eine Standardkurve durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte der Standards gegen die Standardkonzentrationen. Die Probenkonzentration kann durch Interpolation auf der Standardkurve abgelesen werden.

Eine Auswertesoftware mit 4-Parameter-Kurvenanpassung und lin-log Koordinaten für optische Dichte und Konzentration wird empfohlen.

Erwartete Werte

Negativ	< 10 U/mL
Positiv	≥ 10 U/mL

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 ungünstig 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

Kalibrierung

Das Messsystem ist gegen die international anerkannten Referenzseren von E.N. Harris, Louisville und gegen das spezifische Referenzmaterial IRP 97/656 (IgG) und HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM) kalibriert.

Messbereich

Der Messbereich dieses ELISAs beträgt: 0 - 90 U/mL

Normalwerte

Im Rahmen einer Normbereichsstudie mit Proben von gesunden Blutspendern wurden für diesen ELISA die folgenden Werte ermittelt:

Cut-off : 10 U/mL

Linearität

Patientenproben mit hoher spezifischer Antikörperkonzentration wurden in verdünntem BU linear verdünnt, um den dynamischen Messbereich des Assays darzustellen. Die Antikörperaktivität jeder Verdünnungsstufe wurde auf einer Standardkurve mit 4-Parameter-Kurvenanpassung abgelesen.

Probe	Verdünnung	Gemessen [U/mL]	Erwartet [U/mL]	G/E [%]
1	1:100	91,0	91,0	100
	1:200	47,7	45,5	105
	1:400	24,0	22,8	105
	1:800	11,5	11,4	101
	1:1600	6,0	5,7	105
2	1:100	69,1	69,1	100
	1:200	33,5	34,6	97
	1:400	15,9	17,3	92
	1:800	7,8	8,6	91
	1:1600	4,1	4,3	95

Nachweisgrenze

Die funktionale Sensitivität wurde getestet und bestimmt mit 1 U/ml.

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Präzision:

Der Variationskoeffizient (VK) wurde berechnet für drei Proben mit je 24 Bestimmungen in einem Lauf. Ergebnisse der Präzision in der Serie sind in der Tabelle zusammengefasst.

Intra-Assay		
Probe	Mittelwert [U/mL]	VK [%]
1	5,8	12,4
2	15,8	8,1
3	43,7	4,7
4	75,9	2,5

Inter-Assay Präzision:

Der Variationskoeffizient (VK) wurde berechnet für drei Proben aus jeweils 6 Bestimmungen in 5 Läufen.

Ergebnisse der Präzision von Lauf-zu-Lauf sind in der Tabelle zusammengefasst.

Inter-Assay		
Probe	Mittelwert [U/mL]	VK [%]
1	4,5	13,3
2	14,8	5,2
3	42,1	4,1
4	70,2	6,6

Interferenzen

Es konnten keine Interferenzen mit hämolytischen (bis 1000 mg/dL), lipämischen (bis 3 g/dL Triglyceride) oder Seren mit erhöhten Bilirubinwerten (bis 40 mg/dL) beobachtet werden. Wir empfehlen jedoch aus praktischen Gründen die Verwendung von stark hämolytischen oder lipämischen Proben zu vermeiden. Des Weiteren wurden keine interferierenden Effekte mit Antikoagulantien (EDTA, Heparin, Citrat) beobachtet.

Studienergebnisse

Studienpopulation	n	n Pos IgG	[%]
Primäre APS	8	8	100
Secundäre APS	65	61	93,8
Normal humanseren	150	8	5,3

EIASON® Anti Cardiolipin Screen		Klinische Diagnose		
		Positiv	Negativ	
	Positiv	69	8	
	Negativ	4	142	
	Summe	73	150	223

Sensitivität: 94,5 %
 Spezifität: 94,7 %
 Diagnostische Effizienz: 94,6 %

Grenzen des Tests

Der EIASON® Anti-Cardiolipin Screen ist eine diagnostische Hilfe. Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht auf dem Ergebnis eines einzelnen Tests beruhen, sie sollte durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen und labordiagnostischen Befunde erhoben werden. Die angegebenen Referenzbereiche für pathologische und normale Antikörperkonzentration in der Patientenprobe sollten als Empfehlung angesehen werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich etablieren nach ISO 15189 oder nach anderen anwendbaren Laborrichtlinien.

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines

Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

1. Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De F, V, Ruffatti A, Bison E et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res* 2011; 128(6):583-6.
2. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de LB, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):191-205.
3. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13(1):70-6.
4. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies- from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(4):192-9.
5. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7(11):1767-73.
6. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):230.
7. Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3):447-61.
8. Fischer MJ, Rauch J, Levine JS. The antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 27(1):35-46.
9. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113(5):985-94.
10. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109(4):704-15.

11. Hughes GR. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32(3):260-4.
12. Hughes GR. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome): ten clinical lessons. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):262-6.
13. Hughes GR. Antiphospholipid syndrome, migraine and stroke. *Lupus* 2010; 19(5):555-6.
14. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13(3):486-9.
15. Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3):129-33.
16. Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1):1-10.
17. Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev* 2006; 5(1):70-5.
18. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
19. Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De CC et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(2):291-6.
20. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(4):335-9.
21. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120(1):127-33.
22. Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G et al. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):182-90.
23. Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2):358-60.
24. Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol JID - 9012268* 2002; 15 Suppl 6:S20-S27.
25. Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010; 19(4):432-5.
26. Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2):268-74.
27. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309-11.
28. Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, Baumgart K, Bird R, Brighton TA et al. Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 2008; 40(1):58-63.
29. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36(1):63-8.

Arbeitsschema

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

1. Verdünnung	Samples 1:100 with BU
2. Pipettieren	CAL A – CAL D diluted samples 100 µL
3. Inkubieren	30 min at room temperature (20-25°C)
4. Waschen	3 x waschen: Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL WASH pipettieren Vorgang 2 mal wiederholen auf Zellstoff abtropfen
5. Pipettieren	CONJ 100µL
6. Inkubieren	15 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
7. Waschen	3 x waschen: siehe Punkt 4
8. Pipettieren	SUB 100µL
9. Inkubieren	15 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
10. Pipettieren	STOP 100µL
11. Inkubieren	5 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
12. Messen	450 nm (RF 620nm) Optional Overage Filter: 405 nm, Faktor: 3 (vom Photometer abhängig), innerhalb von 5 Min. Ergebnisberechnung: 4-Parameter

Normalwerte

Negativ	< 10 U/mL
---------	-----------

Positiv	≥ 10 U/mL
---------	-----------
