

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

CLIA Kompliziertheit: Hoch

## Verwendungszweck

QUANTA Lite™  $\beta_2$  GPI IgA ist ein semi-quantitativer Enzym-Immunoassay (ELISA) zur Bestimmung von IgA Autoantikörpern gegen  $\beta_2$  Glykoprotein I ( $\beta_2$  GPI). Dieser Test ist hilfreich bei der Diagnose von bestimmten thrombotischen Autoimmun-Erkrankungen, wie jene sekundär zu Systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder anderen Lupus-ähnlichen thrombotischen Erkrankungen.

## Informationen zum Test

Der Nachweis von Anticardiolipin-Antikörper (ACA) wurde häufig mit venösen und arteriellen Thrombosen assoziiert.<sup>1-5</sup> Diese Erkenntnisse wurden erstmals bei Studien über den Systemischen Lupus erythematoses (SLE) gewonnen, eine Krankheit, die Thrombosen als eines von vielen Symptomen beinhaltet.<sup>6,7</sup> Neuere Studien<sup>8-12</sup> haben gezeigt, daß ein 50kD Serum-Kofaktor für Anti-Cardiolipin-Antikörper notwendig ist, um an Mikrotiterplatten gebundenes Cardiolipin zu binden. Der Kofaktor wurde als  $\beta_2$ -Glykoprotein I identifiziert, er wird auch als Apolipoprotein H bezeichnet.<sup>8,12,13,14</sup> Obwohl  $\beta_2$  GPI als in-vitro-Inhibitor der intrinsischen Gerinnungskaskade,<sup>15</sup> der ADP-abhängigen Aggregation<sup>16</sup> und Inhibitor der Prothrombinase-Aktivität von aktivierten Thrombozyten<sup>17</sup> bekannt ist, ist dessen physiologische Funktion immer noch unklar.

Es wurde offensichtlich, daß Anticardiolipin-Antikörper von Patienten mit Anti-Phospholipid Syndrom (APS) als Epitop eine modifizierte  $\beta_2$  GPI Struktur erkennen und nicht Cardiolipin, natives  $\beta_2$  GPI oder ein Epitop, das strukturell durch Cardiolipin als auch  $\beta_2$  GPI definiert ist.<sup>8-12</sup>

Galli et al.<sup>9</sup> und Viard et al.<sup>18</sup> berichteten unabhängig voneinander, daß Anti-Cardiolipin-Antikörper von Autoimmunpatienten (z.B. SLE und/oder APS) gegen das auf Mikrotiterplatten gebundene  $\beta_2$  GPI Molekül gerichtet sind. Koike<sup>11</sup> und Matsuura<sup>12</sup> haben gezeigt, daß  $\beta_2$  GPI tatsächlich das Antigen ist, an das Anticardiolipin-Antikörper binden, und haben weiterhin herausgefunden, daß Phospholipid lediglich als Verbindung zwischen  $\beta_2$  GPI und der festen Phase dient.

Es ist bekannt, daß man mit herkömmlichen Anticardiolipin-Antikörper Tests falsch positive Ergebnisse erhält, die durch Kreuzreaktionen von Phospholipiden mit Serumproben von Patienten mit infektiösen Erkrankungen (Syphilis) und mit anderen Autoantikörpern, wie dsDNA, bedingt sind.<sup>2,3</sup> Durch die Eliminierung des Phospholipids aus der festen Phase und alleiniger Verwendung von  $\beta_2$  GPI wird der Test spezifischer für die Erkennung möglicher Gerinnungsprobleme. Diese erhöhte Spezifität wurde überzeugend von mehreren Arbeitsgruppen aufgezeigt.<sup>11,12,16,17,19,20,21,22</sup> Der  $\beta_2$  GPI Autoantikörper Test ist ein nützlicher und spezifischerer Test, der in Verbindung mit herkömmlich verwendeten Anticardiolipin-Antikörper und Lupus Antikoagulans Tests zur Einschätzung des Thromboserisikos bei Risikopatienten verwendet werden soll.

$\beta_2$  GPI Antikörper vom Isotyp IgG wurden bei 17 von 47 SLE Patienten (36%) nachgewiesen.<sup>18</sup> Neun dieser 47 SLE-Patienten hatten Thrombosen und 8 von ihnen (89%) hatten  $\beta_2$  GPI-Antikörper. Hisham et al.<sup>20</sup> fanden  $\beta_2$  GPI-Antikörper vom Isotyp IgG in allen fünf Patienten (100%) mit zumindest zwei dokumentierten klinischen Manifestationen von APS. Alle fünf dieser Patienten wurden in die Gruppe mit hohen Werten von  $\beta_2$  GPI Antikörper eingestuft. Bei acht von 14 Patienten (57%), die in die Gruppe mit niedrigen Werten von  $\beta_2$  GPI Antikörpern eingestuft waren, trat zumindest ein Thrombosefall auf.

Tsutsumi et al.<sup>22</sup> fanden IgG- und IgM-Antikörper gegen  $\beta_2$  GPI in 10,1%, bzw. 5,8% von 308 zufällig ausgewählten SLE-Patienten in Japan.  $\beta_2$  GPI-Antikörper vom Isotyp IgG wurden häufiger bei Patienten mit vorangegangenen Thrombosen gefunden. Diese Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls, daß von 15 Patienten mit mehrmaligem Abort 20% IgG  $\beta_2$  GPI positiv waren. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß Patienten mit vorangegangenen Thrombosen eher positiv für IgM  $\beta_2$  GPI waren und daß die Titer von IgM  $\beta_2$  GPI in der Gruppe mit Thrombosen höher waren als in der Gruppe ohne Thrombosen. Von den 15 Patienten ohne vorangegangene Aborte war keiner IgM  $\beta_2$  GPI positiv.

Cabiedes et al.<sup>23</sup> haben 94 SLE Patienten untersucht, 39 von ihnen hatten klinische Manifestationen von APS. Die Verbindung von klinischen Manifestationen des APS war stärker assoziiert mit  $\beta_2$  GPI-Antikörper als mit dem positiven Ergebnis im herkömmlichen ACA Test. Anti- $\beta_2$  GPI-Antikörper vom Isotyp IgG waren bei 16 von 18 Patientenseren (89%) mit APS nachzuweisen. Von 22 Patienten mit positivem ACA Ergebnis, jedoch bisher ohne klinische Manifestation von APS, war keiner  $\beta_2$  GPI positiv.

Cerrato et al.<sup>24</sup> fanden Anti- $\beta_2$  GPI-AK vom IgG-Isotyp bei 87,5% in einer Gruppe von 32 Patienten mit thrombotischem Geschehen (APS). Anti- $\beta_2$  GPI-AK vom IgM-Isotyp wurden zu 71,9% bei der gleichen Gruppe gefunden.

Sebastiani et al.<sup>25</sup> wiesen Anti- $\beta_2$  GPI-AK vom IgM-Isotyp bei 110 Patienten (20,3%) und IgG bei 109 Patienten (20,1%) bei einer Gesamtanzahl von 542 SLE-Patienten nach. Die Anwesenheit von Anti- $\beta_2$  GPI-AK war stark mit ACA ( $p < 10^{-5}$ ) assoziiert. Weiterhin zeigten sie, daß Anti- $\beta_2$  GPI-Antikörper vom Isotyp IgG und IgM mit arteriellen und venösen Thrombosen in Verbindung stehen.

## Testprinzip

Der QUANTA Lite™  $\beta_2$  GPI IgA ist ein ELISA für die Bestimmung von Antikörpern aus Humanserum gegen  $\beta_2$  GPI unter Verwendung der Sandwich ELISA-Technik. Gereinigtes  $\beta_2$  GPI Antigen wurde an die Kavitäten der Polystyrol-Mikrotiterplatte unter Wahrung der ursprünglichen Konfiguration gebunden. Vorverdünnte Kontrollen und verdünnte Patientenserum werden in verschiedene Kavitäten pipettiert. Die vorhandenen  $\beta_2$  Antikörper binden an die gebundenen Antigene. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humanes IgA Konjugat wird in die Kavitäten pipettiert und bindet während einer zweiten Inkubation an den Patienten-Antikörper. Nachdem in einem weiteren Waschschrift das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird mit einem Peroxidase-Substrat eine Farbreaktion mit dem gebundenen Enzym ausgelöst. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion wird der Test durch Vergleich der OD-Werte der Patienten mit denen einer Fünf-Punkte-Kalibrationskurve ausgewertet. Die Ergebnisse werden semi-quantitativ in Standard IgA Anti- $\beta_2$  GPI Units (SAU) angegeben.

## Inhalt der Testpackung

1. Mikrotiter-ELISA-Platte beschichtet mit gereinigtem  $\beta_2$  Antigen (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter in Folienverpackung und Desiccant (Trockenmittel)
2. ELISA Negative Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum ohne humane Antikörper gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
1.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrator A, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
2.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrator B, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
3.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrator C, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
4.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrator D, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
5.  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrator E, 1 Flasche Puffer mit Stabilisator und Humanserum mit humanen Antikörpern gegen  $\beta_2$  GPI, gebrauchsfertig vorverdünnt, 1,2 mL
9. HRP Probenverdünner, 1 Flasche - rosa gefärbt mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung, Tween 20, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 50 mL
10. HRP Waschkonzentrat, 1 Flasche mit 40fachem Konzentrat - rot gefärbt mit gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20, 25 mL. Zur Verdünnung bitte das entsprechende Kapitel in der Anleitung beachten.
11. HRP IgA-Konjugat, (Ziege), anti-humanes IgA, 1 Flasche - gelb gefärbt mit Puffer, Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, 10 mL
12. TMB Chromogen, 1 Flasche mit Stabilisatoren, 10 mL
13. HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure, 1 Flasche - farblos, 10 mL

## Hinweise

1. VORSICHT: Probenverdünner, Kontrollen und Konjugat enthalten 0,02% Chloramphenicol. Es ist im US-Bundesstaat Kalifornien und allgemein bekannt, daß dieser Stoff Krebs verursachen kann.
2. Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.<sup>26</sup>
3.  $\text{NaN}_3$  wird als Stabilisator verwendet.  $\text{NaN}_3$  ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
4. Das HRP-Konjugat enthält eine verdünnte Chemikalie, die bei Einnahme in großen Mengen toxisch wirken kann. Daher den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
5. Das TMB Chromogen enthält ein Reizmittel, das bei Inhalation, Einnahme oder Absorption durch die Haut gesundheitliche Schäden verursachen kann. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
6. Die HRP Stopplösung besteht aus einer verdünnten Schwefelsäure. Den Kontakt mit Basen, Metallen und anderen Stoffen, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Schwefelsäure ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen hervorrufen. Den Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
7. Die vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung während der Arbeit mit Reagenzien tragen.
8. Verschüttete Reagenzien sofort beseitigen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle Umweltvorschriften beachten.

## Vorsichtsmaßnahmen

1. Dieser Test ist für "In-Vitro Diagnostik".
2. Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
3. Unvollständiges Waschen und ungenügendes Entfernen der Flüssigkeiten aus den ELISA-Kavitäten führt zu einer schlechten Präzision und zu hohen Hintergrund-Extinktionen.

4. Die Adaptation dieses Testsystems auf automatische Probenverarbeitung und andere Instrumentierung, ganz oder teilweise, kann unterschiedliche Ergebnisse zur manuellen Durchführung ergeben. Es liegt in der Verantwortung eines jeden Labors, die automatische Bearbeitung so zu überprüfen, daß Testergebnisse innerhalb akzeptabler Bereiche erzielt werden.
5. Eine Reihe von Faktoren beeinflusst das Testergebnis. Hierzu zählen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Pipettierens, der Typ des verwendeten Photometers, die Temperatur der Reagenzien, die Umgebungs-Temperatur, die Gründlichkeit des Waschens und der Entfernung der Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der ELISA-Streifen, und die Einhaltung der Inkubationszeiten. Es ist deshalb sehr wichtig, für gleichbleibende Bedingungen zu sorgen.
6. Die strikte Einhaltung der Testprozedur wird empfohlen. Jede Änderung im Protokoll erfolgt auf Risiko des Anwenders.
7. Das unvollständige Verschließen der Mikrotiterkavitäten und des Trockenmittels (Desiccants) führt zu Antigenabbau und schlechter Präzision.
8. Eine unakzeptabel niedrige Absorption kann beobachtet werden, wenn eine Flasche HRP Konjugat bei **zwei-** oder mehrfachem Gebrauch über einen längeren Zeitraum benutzt wird. Daher ist es wichtig, die Hinweise zum Umgang mit dem HRP Konjugat genau zu beachten.
9. Chemische Kontamination des HRP Konjugates kann durch unzureichendes Reinigen oder Spülen der Ausrüstung oder der Instrumente verursacht werden. Rückstände gebräuchlicher Laborchemikalien wie z.B. Formalin, Bleichmittel, Ethanol oder Spülmittel führen zum Abbau des HRP Konjugates im Laufe der Zeit. Das gründliche Spülen der gesamten Ausrüstung und Instrumentierung nach Verwendung chemischer Reinigungsmittel ist daher unbedingt erforderlich.

## Lagerung

1. Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
2. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen wieder in die Originalverpackung mit einliegendem Desiccant (Trockenmittel) geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen.
3. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C eine Woche stabil.

## Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Werden Azide oder andere Stabilisatoren zu den Serumproben gegeben, können die Ergebnisse nachteilig beeinflusst werden. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden. Nach der Blutentnahme ist das Serum vom Blut zu trennen. Das NCCLS Dokument H18-A2 empfiehlt die folgenden Lagerungsbedingungen für Patientenproben: 1) Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. 2) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. 3) Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen, ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen und vor der Testung gut geschüttelt werden.

## Testdurchführung, In der Testpackung vorhandenes Material

- |   |  |
|---|--|
| 1 | β <sub>2</sub> GPI ELISA Mikrotiterplatte (12-1 x 8 Kavitäten), mit Streifenhalter |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnte ELISA Negative Kontrolle                                       |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnte β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kontrolle                         |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnter β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kalibrator A                     |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnter β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kalibrator B                     |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnter β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kalibrator C                     |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnter β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kalibrator D                     |
| 1 | 1,2 mL vorverdünnter β <sub>2</sub> GPI IgA ELISA Kalibrator E                     |
| 1 | 50 mL HRP Probenverdünner  |
| 1 | 25 mL HRP Waschkonzentrat, 40faches Konzentrat                                     |
| 1 | 10 mL HRP IgA Konjugat (von der Ziege), anti-humanes IgA                           |
| 1 | 10 mL TMB Chromogen  |
| 1 | 10 mL HRP Stopplösung, 0,344M Schwefelsäure  |

## Zusätzliches benötigtes Material

Pipetten für 5, 100, 200-300 und 500 µL  
 Einmal-Pipettenspitzen  
 Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen  
 Destilliertes oder deionisiertes Wasser  
 1 L Gefäß für verdünntes HRP-Waschkonzentrat  
 Reader für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (und 620 nm für eine bichromatische Messung)

## Methode ,Testvorbereitung

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) und gründlich mischen.
2. Den gesamten Inhalt (25 mL) des Waschkonzentrats mit 975 mL Aqua dest. mischen (1:40 Verdünnung). Die verdünnte Pufferlösung ist bei 2-8°C eine Woche stabil. Soll nicht die gesamte Mikrotiterplatte auf einmal verwendet werden, so können für einen Ansatz von 16 Kavitäten 2 mL Konzentrat mit 78 mL Aqua dest. gemischt werden.

3. Serumproben 1:101 verdünnen, indem 5 µL Serum mit 500 µL gebrauchsfertigem Probenverdünner gemischt werden. Verdünnte Proben sollen innerhalb von 8 Stunden getestet werden. Die  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibratoren, die  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle **nicht verdünnen**.
4. Jeder Test benötigt zwei Kavitäten für die Kalibratoren und Kontrollen sowie eine oder zwei Kavitäten für die Patientenprobe. Es wird empfohlen, alle Proben in Doppelbestimmung anzusetzen.
5. Standardkurve vorbereiten: Für Punkte A bis E der Standardkurve mit 5 Punkten die **VORVERDÜNNTEN** ELISA-Kalibratoren  $\beta_2$  GPI IgA A bis E direkt aus den Fläschchen benutzen. Die Standardkurve mit fünf Punkten hat die folgenden Werte:

Punkt #	Standard IgA $\beta_2$ GPI Units (SAU)
A Vorverdünnter $\beta_2$ GPI IgA ELISA Kalibrator A	150,0
B Vorverdünnter $\beta_2$ GPI IgA ELISA Kalibrator B	75,0
C Vorverdünnter $\beta_2$ GPI IgA ELISA Kalibrator C	37,5
D Vorverdünnter $\beta_2$ GPI IgA ELISA Kalibrator D	18,8 oder 18,75
E Vorverdünnter $\beta_2$ GPI IgA ELISA Kalibrator E	9,4 oder 9,375

## Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.** Die entsprechende Anzahl Mikrotiterkavitäten abbrechen. Die Kavitäten im Rahmen befestigen. Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, **luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
2. 100µL von jedem der fünf Kalibratoren, der verdünnten Patientenproben, der ELISA Negative Kontrolle und der  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. HINWEIS: Sowohl  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle als auch ELISA Negative Kontrolle sind vorverdünnt und gebrauchsfertig. Der Wert und der akzeptable Bereich der  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle ist auf dem Fläschchen-Etikett angegeben. Falls die Kontrolle nicht in den angegebenen Bereich fällt, muß der Testlauf wiederholt werden.
3. Streifen abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren. Die Inkubationszeit beginnt nach Zugabe der letzten Probe.
4. Waschen: Den Inhalt aller Kavitäten absaugen. Die Kavitäten vollständig (200-300 µL) mit **verdünntem** HRP Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch zweimal wiederholen (insgesamt: drei Waschschriffe). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um die restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Die Waschschriffe sind in der selben Reihenfolge wie die Pipettierschriffe durchzuführen.
5. 100 µL des HRP IgA Konjugates in jede Kavität geben. Sterile Pipetten verwenden! Nur das benötigte Volumen an Konjugat aus der Flasche entnehmen. **UNBENUTZTES KONJUGAT NICHT IN DIE FLASCHE ZURÜCKPIPETTIEREN. KONTAMINATIONSGEFAHR!!** Abgedeckte Streifen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren, wie in 3. beschrieben.
6. Waschen: Schritt Nr. 4 wiederholen.
7. 100 µL TMB Chromogen in jede Kavität geben. 30 Minuten **im Dunkeln** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 100 µL HRP Stopplösung in jede Kavität pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des TMB Chromogens einhalten. Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln.
9. Die optische Dichte (OD) jeder Kavität bei 450 nm innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen. Es wird eine bichromatische Messung mit 620 nm als Referenzwellenlänge empfohlen.

## Qualitätskontrolle

1. Die  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibratoren,  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden, um sicherzustellen, daß alle Reagenzien und der Testansatz insgesamt ordnungsgemäß funktionieren.
2. Da die  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibratoren,  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle und die ELISA Negative Kontrolle vorverdünnt sind, entfällt der Verdünnungsschritt der Patientenproben für die Kontrollen.
3. Zusätzliche Kontrollen zur Qualitätssicherung können gemäß den Richtlinien nationaler oder internationaler Regulierungs- oder Akkreditierungsbehörden eingesetzt werden. Geeignete Kontrollen können aus Humanserum gewonnen und bei  $\leq -20^\circ\text{C}$  gelagert werden.
4. Um sicher zu sein, daß alle Patientenwerte korrekt sind, müssen die nachfolgenden Kriterien erfüllt werden (Wurden ein oder mehrere Kriterien nicht erfüllt, so ist das Ergebnis als ungültig zu betrachten und der Testansatz ist zu wiederholen).
  - a. Die Absorption des vorverdünnten  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrators A muß größer sein als die Absorption der vorverdünnten  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle. Die Absorption der  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle wiederum muß größer sein als die der vorverdünnten ELISA Negative Kontrolle.
  - b. Die Absorption des vorverdünnten  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kalibrators A muß größer als 1,0 sein, die Absorption der vorverdünnten Negative Kontrolle darf nicht größer als 0,2 sein.
  - c. Die Absorption der  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle muß mehr als doppelt so hoch sein wie die Absorption der ELISA Negativen Kontrolle oder über 0,25 liegen.

- d. Die Konzentration der  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kontrolle muß innerhalb des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereichs liegen.
- e. Der Anwender kann unter anderem das NCCLS Dokument Nr. C24-A für zusätzliche Hinweise zur zeitgemäßen Qualitätskontrolle konsultieren.

## Berechnung der Ergebnisse

1. Den Mittelwert aller Doppelbestimmungen ermitteln.
2. Die errechneten Mittelwerte der Absorption der einzelnen Kalibratoren gegen den log der entsprechenden Konzentrationen auftragen und durch die Punkte eine Kurve zeichnen. Alternativ kann auch eine log/log Auswertung durchgeführt werden. Die SAU-Units der verschiedenen Kalibratoren sind auf den Fläschchen-Etiketten aufgedruckt.
3. Die unbekannte  $\beta_2$  GPI IgA-Konzentration in Standard IgA  $\beta_2$  GPI Units (SAU) über die "X"- Achse bestimmen, indem die ermittelte Absorption auf der "Y"-Achse abgelesen wird.
4. Negative Ergebnisse haben einen Wert von 0-20 Units, positive Ergebnisse >20 Units (SAU).

## Interpretation der Ergebnisse

Dieser ELISA-Test ist sehr sensitiv und in der Lage, sogar kleine Unterschiede in Patientenpopulationen zu messen. Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

1. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von  $\beta_2$  GPI IgA Antikörpern an und legt die Möglichkeit des Vorkommens bestimmter thrombotischer Autoimmun-Erkrankungen nahe, wie z.B. jene sekundär zu Systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder anderen Lupus-ähnlichen thrombotischen Erkrankungen.
2. Ein negatives Ergebnis deutet auf das Nichtvorhandensein von  $\beta_2$  GPI IgA Antikörpern oder auf Konzentrationen unterhalb der Erfassungsgrenze des Testsystems hin.
3. Wir schlagen vor, die Laborergebnisse mit folgendem Hinweis zu versehen: „Die folgenden Ergebnisse wurden mit dem INOVA QUANTA Lite™  $\beta_2$  GPI IgA ELISA erzielt.  $\beta_2$  GPI IgA Werte, die mit Testsystemen anderer Hersteller erzielt wurden, können nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Höhe des gefundenen IgA-Titers kann nicht mit einem Endpunkttiter in Korrelation gebracht werden.“

## Grenzen des Verfahrens

1. Die klinische Signifikanz von  $\beta_2$  GPI-Antikörper bei nicht-SLE Erkrankungen wird gegenwärtig untersucht.
2. Werden negative  $\beta_2$  GPI-Antikörper Titer in der Gegenwart von klinischen Indikationen vorgefunden, wird die Untersuchung mit Lupus Antikoagulans, ACA oder anderen zusätzlichen Tests empfohlen.
3. Die Diagnose kann nicht allein auf Grundlage der  $\beta_2$  GPI-Antikörper Resultate erstellt werden. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit klinischen Erkenntnissen zu interpretieren.
4. Behandlungen dürfen nicht allein auf der Basis des  $\beta_2$  GPI-Titers induziert werden. Andere klinische Indikationen müssen ebenfalls gegeben sein.
5. Es kann vorkommen, daß einige Proben ACA positiv sind, jedoch  $\beta_2$  GPI negativ. Der  $\beta_2$  GPI Test ist ein spezifischerer Marker für das Thromboserisiko. Der ACA Test kann falsch positive Ergebnisse in Verbindung mit der Kreuzreaktivität mit dsDNA oder bestimmten Antikörpern bei infektiösen Erkrankungen produzieren.
6. Die Leistungscharakteristika für andere Untersuchungsmaterialien als Serum wurden nicht bestimmt.

## Erwartungswerte und spezifische Leistungscharakteristika

Eine Gesamtanzahl von 215 Normalseren wurde mit dem QUANTA Lite™  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Kit getestet. Diese Gruppe bestand ungefähr zu gleichen Teilen aus Männern und Frauen im Alter von 18 bis 58 Jahren. Sieben dieser Proben (3,2%) waren positiv für IgA  $\beta_2$  GPI Antikörper. Der Durchschnittswert dieser Normalpopulation betrug 2,52 SAU.

Die nachfolgende Tabelle faßt die Ergebnisse der internen und externen klinischen Studien des QUANTA Lite™  $\beta_2$  GPI IgA ELISA Tests zusammen.

Patientengruppe	Anzahl	Anzahl Positiv	(%)
SLE + APS*	14	10	(71,4)
APS	48	26	(54,2)
SLE (ohne APS)	24	7	(29,2)
Infektiöse Erkrankungen**	30	0	(0,0)
Normalseren	215	7	(3,2)

\* APS = Antiphospholipid Syndrom

\*\* Die meisten davon waren positiv in der Syphilis-Serologie

Basierend auf den obigen Daten ergibt sich eine klinische Sensitivität für den IgA  $\beta_2$  GPI Antikörper Test von 58,1%. Spezifität und klinische Effektivität von jeweils 94,8% und 87,9%.

## Relative Sensitivität und Spezifität

### Korrelation mit dem $\beta_2$ GPI IgA ELISA

Der IgA  $\beta_2$  GPI Kit wurde mit einem IgA Anti-Cardiolipin Antikörper (ACA) Test verglichen. 14 Normalseren, 16 APS Patientenseren und 22 Seren von SLE Patienten ohne offensichtlichem thrombotischen Geschehen wurden evaluiert. Diese Vergleichsstudie ist nachfolgend zusammengefasst:

		IgA $\beta_2$ GPI			
		+	-		
IgA ACA	+	6	6**	Relative Sensitivität	50,0%
	-	8*	32	Relative Spezifität	80,0%
				Relative Übereinstimmung	74,1%

\* 2 dieser Patienten waren aus der Gruppe mit APS. Die anderen sechs aus der Gruppe mit SLE.

\*\* 4 dieser 6 Proben waren aus der Gruppe mit APS und 2 aus der Gruppe mit SLE.

Sechs Proben waren in beiden Methoden positiv. Alle sechs Proben stammten aus der Gruppe mit APS. 32 Proben waren in beiden Methoden negativ. Acht Proben waren  $\beta_2$  GPI positiv jedoch ACA negativ. Zwei davon waren aus der APS-Gruppe und die anderen sechs waren aus der Gruppe mit SLE. Drei der sechs  $\beta_2$  GPI positiven, ACA negativen SLE Patienten waren nur schwach positiv für  $\beta_2$  GPI (21, 24 und 29 SAU). Es waren sechs Proben IgA ACA positiv jedoch  $\beta_2$  GPI negativ. Zwei dieser Proben stammten aus der Gruppe mit SLE und vier aus der Gruppe mit APS.

Wenn Regressionen für die IgA ACA und  $\beta_2$  GPI Werte für die 14 Normalseren, die 16 APS-Patienten und die 22 SLE-Patienten berechnet werden, wird ein "r"-Wert von 0,825 mit einer Steigung von 1,31 ermittelt.

### Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision und Reproduzierbarkeit wurden ermittelt, indem eine negative, eine hoch positive und eine schwach positive Probe sechsmal an sechs aufeinanderfolgenden Tagen getestet wurden. Der Durchschnittswert für die negative Probe lag bei 18,2, der der schwach positiven 37,2 und der der stark positiven 79,6. Die Intra- und Interassay Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

	Negativ		Schwach Positiv		Stark Positiv	
	SD	VK	SD	VK	SD	VK
Gesamt	0,82	4,4%	1,61	4,3%	4,06	5,1%
Intraassay	1,22	6,6%	1,49	4,0%	4,07	5,2%
Interassay	1,22	6,6%	1,50	4,0%	3,40	4,2%

### Referenzen

- Harris, E.N., A.E. Gharavi, M.L. Boey, B.M. Patel, C.G. Mackworth-Young, S. Loizou and G.R.V. Hughes. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet, 2: 1211-1214, 1983.
- Koike, T., M. Sueishi, H. Funaki, H. Tomioka and S. Yoshida. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol, 56: 193-199, 1984.
- Asherson, R.A. and E.N. Harris. Anticardiolipin antibodies: clinical associations. Postgrad Med J, 61: 1081-1087, 1986.
- Lockshin, M.D., M.L. Druzin, S. Goei, T. Qamar, M.S. Magid, L. Jovanovic and M. Ferenc. Antibody to cardiolipin as the predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. N Engl J Med, 313: 152-156, 1985.
- McNeil, H.P., C.N. Chesterman and S.A. Krilis. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv Immunol, 49: 193-280, 1991.
- Harris, E.N., A.E. Gharavi and G.R.V. Hughes. Anti-phospholipid antibodies. Clin Rheum Dis, 11: 591-609, 1985.
- Hughes, G.R.V., E.N. Harris and A.E. Gharavi. The anticardiolipin syndrome. J Rheumatol, 13: 486-489, 1986.
- McNeil, H.P., R.J. Simpson, C.N. Chesterman and S.A. Krilis. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA, 87: 4120-4124, 1990.
- Galli, M., P. Comfurius, C. Maassen, H.C. Hemker, M.H. De Baets, P.J.C. Van Breda-Vriesman, T. Barbui, R.F.A. Zwaal and E.M. Bevers. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet, 335: 1544-1547, 1990.
- Matsuura, E., Y. Igarashi, M. Fujimoto, K. Ichikawa and T. Koike. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 336: 177-178, 1990.
- Koike, T. and E. Matsuura. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies? Lancet, 337: 671-672, 1991.
- Matsuura, E., Y. Igarashi, M. Fujimoto, K. Ichikawa, T. Suzuki, T. Sumida, T. Yasuda and T. Koike. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 148: 3885-3891, 1992.

13. Matsuura, E., M. Igarashi, Y. Igarashi, H. Nagae, K. Ichikawa, T. Yasuda and T. Koike. Molecular definition of human  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ -GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of  $\beta_2$ -GPI in alternation of anticardiolipin binding. Int Immunol, 3: 1217-1221, 1991.
14. Igarashi, M., E. Matsuura, Y. Igarashi, H. Nagae, Y. Matsuura, K. Ichikawa, T. Yasuda, D.R. Voelker and T. Koike. Expression of anticardiolipin cofactor, human  $\beta_2$ -glycoprotein I, by a recombinant baculovirus/insect cell system. Clin Exp Immunol, In press.
15. Schousboe, I.  $\beta_2$ -glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. Blood, 66: 1086-1091, 1985.
16. Nimph, J., H. Wurm and G.M. Kostner.  $\beta_2$ -glycoprotein I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. Atherosclerosis, 63: 109-114, 1987.
17. Nimph, J., E.M. Bevers, P.H. Bomans, U. Till, H. Wurm, G.M. Kostner and R.F. Zwaal. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by  $\beta_2$ -glycoprotein I. Biochim Biophys Acta, 884: 142-149, 1986.
18. Viard, J.P., Z. Amoura and J.F. Bach. Association of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. Am J Med, 93: 181-186, 1992.
19. Keil, L.B., M. Galazka, H. El-Kadi, E. Erickson and V. DeBari. Binding of  $\beta_2$ -glycoprotein I to activated polystyrene and its recognition by human IgG autoantibodies. Biotechnol Appl Biochem, 22: 305-313, 1995.
20. Hisham, E., L. Keil and V. DeBari. Analytical and Clinical Relationships between human IgG autoantibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein I and anticardiolipin antibodies. J Rheumatol, 22: 2233-2237, 1995.
21. Roubey, RA. Immunology of the Antiphospholipid Syndrome. Arthritis and Rheumatism, 39: 1444-1454, 1996.
22. Tsutsumi, A. et.al. Antibodies to  $\beta_2$ -Glycoprotein I and Clinical Manifestations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 39: 1466-1474, 1996.
23. Cabiedes, et al. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus patients associate more strongly with anti  $\beta_2$  glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. J Rheumatol, 22: 1899, 1995.
24. Cerrato, et al. Antibodies to prothrombin and  $\beta_2$  glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. Lupus 5: 516, 1996.
25. Sebastiani, G.D., et al. Anti  $\beta_2$  GPI and aCL in SLE-association with clinical manifestation of APS. Lupus, 5: 519, 1996.
26. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition.

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.  
9900 Old Grove Road  
San Diego, CA 92131  
United States of America

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert, Germany  
Tel.: +49-6894-581020  
Fax.: +49-6894-581021  
[www.mt-procons.com](http://www.mt-procons.com)

Technical Service  
628675DEU

888-545-9495  
August 2009  
Revision 9

