

<b>REF 41424</b> 	<b>ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG</b>		Vertrieb durch: 
<b>GEBRAUCHS-ANLEITUNG</b>		  <b>100</b>	

## VERWENDUNGSZWECK

Der Test *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) für die quantitative Bestimmung, mit dem speziellen Analysegerät *ZENIT RA*, von spezifischen,  $\beta_2$ -Glykoprotein-I-abhängigen Antikörpern der Klasse IgG gegen Cardiolipin in humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA, Heparin). Dieser Test dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Beurteilung von Antiphospholipid-Syndrom (APS).  
**ACHTUNG:** Ärztliche Entscheidungen dürfen nicht ausschließlich auf dem Ergebnis dieses Tests beruhen, sondern sind auf der Grundlage der Beurteilung aller verfügbaren klinischen und Labordaten zu treffen.

## KLINISCHE BEDEUTUNG

Bei Patienten mit venösen und/oder arteriellen Thrombosen oder bei Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen ist das Vorliegen von Phospholipid-Antikörpern (aPL) ein essentieller Labormarker (zusammen mit LAC) für die Diagnose des „*Antiphospholipid-Syndroms (APS)*“<sup>1</sup>.

Gemäß den 2006 aktualisierten Kriterien von Sapporo<sup>1</sup> kann die APS-Diagnose bei Vorliegen mindestens eines klinischen Kriteriums und eines Laborkriteriums definiert werden.

Die Laborkriterien sehen ein anhaltendes (12 Wochen) positives Ergebnis mit mittleren/hohen Werten für Cardiolipin-Antikörper (aCL) und/oder  $\beta_2$ -Glykoprotein-I-Antikörper (a- $\beta_2$ GPI) und/oder Lupus-Antikoagulans-Antikörper (LAC) vor.

Die Antikörper aCL und a- $\beta_2$ GPI können vom Isotyp G oder M sein und einen Wert von über 40 U/ml aufweisen.

Das Vorliegen von Phospholipid-Antikörpern wurde zum ersten Mal 1941 in Proben von Patienten mit serologischer Syphilis-Diagnose nachgewiesen<sup>2</sup>. Es wurde gezeigt, dass das Serum dieser Patienten mit dem Phospholipid Cardiolipin reagierte, das in den Rinderherzextrakten des als spezifisch für die Diagnose von Syphilis angesehenen VDRL-Tests (Venereal Disease Research Laboratory) enthalten war.

Die Spezifität des VDRL-Tests wurde aufgrund der zahlreichen falsch-positiven Ergebnisse bei Patienten mit systemischen Autoimmunkrankheiten und ohne Geschlechtskrankheiten in Frage gestellt. Im Jahr 1983 verwendeten Harris et al.<sup>3</sup> eine hochempfindliche Methode für die Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern und fanden bei 61 % von Patienten mit SLE hohe aCL-Konzentrationen, womit sie einen bedeutenden Zusammenhang zwischen Antikörperwerten und venösen und arteriellen Thrombosen, Lupus-Antikoagulans und Thrombozytopenie zeigten.

Zwei unabhängige Forschungsgruppen<sup>4, 5</sup> zeigten 1990, dass für den Nachweis von Cardiolipin-Antikörpern das Vorliegen von  $\beta_2$ -Glycoprotein I unerlässlich ist.

$\beta_2$ -Glykoprotein I hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa, eine Plasmakonzentration von etwa 0,15-0,30 mg/ml und eine derzeit noch unbekannt biologische Funktion (es scheint in der Lage zu sein, den Stoffwechsel der Lipoproteine zu beeinflussen, in einige Koagulationsreaktionen einzugreifen und der Gerinnung der Blutplättchen entgegenzuwirken<sup>6-9</sup>). Neuere kristallographische Studien haben die dreidimensionale Struktur des Proteins und seine Organisation in 5 Domänen definiert<sup>10-11</sup> und so nützliche Informationen über die Funktion dieses Moleküls geliefert.

Insbesondere zeigt die fünfte Domäne zahlreiche Lysinreste, die für die elektrostatische Wechselwirkung von  $\beta_2$ -Glycoprotein I mit den anionischen Phospholipiden der Zellmembranen verantwortlich sind<sup>12</sup>. Über denselben Mechanismus findet in vitro die Bindung zwischen  $\beta_2$ -Glykoprotein und dem auf der Festphase adsorbierten Cardiolipin statt. Es wurde ausführlich nachgewiesen, dass die Cardiolipin-Antikörper von Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom einen modifizierten Teil von  $\beta_2$ -Glykoprotein I erkennen; diese Autoantikörper sind nicht in der Lage, Cardiolipin, natives, nicht an Festphasen gebundenes  $\beta_2$ -Glykoprotein oder andere Strukturen zu erkennen<sup>4, 5, 13-15</sup>.

Der heutige Wissensstand ermöglicht es uns, Cardiolipin-Antikörper als Antikörper zu definieren, die sich an Neoepitope binden können, die durch die Bindung zwischen  $\beta_2$ -Glykoprotein und dem auf einer Festphase adsorbierten Cardiolipin entstehen.

Es wurde anschließend nachgewiesen<sup>4, 16</sup>, dass Cardiolipin-Antikörper bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten direkt auf UV-behandelten oder bestrahlten Polystyrol-Mikroplatten adsorbiertes  $\beta_2$ -Glykoprotein I erkennen können. Auch in diesem Fall hängt das Erkennen des Moleküls durch die Autoantikörper von den durch die Bindung des Proteins an die Festphase verursachten strukturellen Veränderungen ab.

## PRINZIP DER METHODE

---

Der Kit *ZENIT CARDIOLIPIN IgG* für die quantitative Bestimmung von spezifischen,  $\beta_2$ -Glykoprotein-I-abhängigen IgG gegen Cardiolipin verwendet eine indirekte immunologische Methode in zwei Schritten auf der Grundlage des Chemilumineszenzprinzips.

Der Komplex aus Cardiolipin und  $\beta_2$ -Glykoprotein I wird zur Beschichtung der Magnetpartikel verwendet (Festphase), und ein Antikörper gegen humane IgG wird mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat).

Während der ersten Inkubation binden sich die spezifischen Antikörper in der Probe, in den Kalibratoren oder in den Kontrollseren an die Festphase.

Während der zweiten Inkubation reagiert das Konjugat mit den an die Festphase gebundenen Cardiolipin-IgG-Antikörpern.

Nach jeder Inkubation wird das nicht an die Festphase gebundene Material durch Absaugen und anschließendes Waschen entfernt.

Die Menge des markierten Konjugats, das an die Festphase gebunden wurde, wird mittels Aktivierung der Chemilumineszenzreaktion und Messung des Lichtsignals bewertet. Das erzeugte Signal wird in relativen Lichteinheiten (RLU - Relative Light Units) ausgedrückt und zeigt die Konzentration der in der Probe, in den Kalibratoren und in den Kontrollseren vorliegenden spezifischen Antikörper an.

## AUTOMATISIERUNG

---

Das Analysegerät *ZENIT RA* führt automatisch alle Schritte durch, die im Protokoll für den Test vorgesehen sind: Hinzufügen von Proben, Kalibratoren, Kontrollseren, Magnetpartikeln, Konjugat und Aktivierungslösungen für die Chemilumineszenz in den Reaktionsbehälter; magnetische Trennung und Waschen der Partikel; Messen des emittierten Lichts.

Das System berechnet die Testergebnisse der Proben und Kontrollseren mittels der gespeicherten Kalibrierungskurve und druckt einen Bericht aus, der alle Informationen bezüglich des Tests und des Patienten enthält.

## MATERIALIEN UND REAGENZIEN

---

### Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Magnetpartikel, beschichtet mit einem Komplex aus Cardiolipin und  $\beta_2$ -Glykoprotein I, in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen, Tensid, Pro-Clin 300 und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Monoklonale Mausantikörper gegen humane IgG, mit einem Acridiniumester-Derivat markiert (Konjugat), in Phosphatpuffer mit Stabilisatorproteinen und Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Probenverdünnungsmittel: Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO<sub>4</sub> als Konservierungsmittel.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Humanserum mit niedriger Konzentration von Cardiolipin-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO<sub>4</sub> als Konservierungsmittel.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Humanserum mit hoher Konzentration von Cardiolipin-IgG-Antikörpern in Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin, einem Tensid, einem inaktiven blauen Farbstoff, Pro-Clin 300 und Gentamicin-SO<sub>4</sub> als Konservierungsmittel.

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Die Reagenzien 1, 2 und 3 sind in einem gemeinsamen Behälter, der Reagenzienkartusche, zusammengestellt.

Die Konzentrationen der Kalibratoren sind in GPL U/ml (GPL-Einheiten) angegeben und gegen die „Harris“-Referenzseren kalibriert. Die für jede Produktcharge spezifischen Konzentrationswerte sind in der im Kit enthaltenen DATA DISK verzeichnet.

DATA DISK

Mini-DVD mit Informationen zu allen Produkte der Reihe ZENIT RA (Reagenzien, Kalibratoren, Kontrollseren), aktualisiert bis zur letzten Produktionscharge, unter Ausschluss der Produkte, die zum Zeitpunkt der Zusammenstellung der neuen DATA DISK abgelaufen sind.

Es reicht aus, die DATA DISK mit der höchsten Chargennummer aufzubewahren, um die für den korrekten Betrieb des Systems notwendigen Informationen auf dem jeweils aktuellsten Stand zu halten.

Benötigte, im Kit nicht mitgelieferte Materialien und Reagenzien

- ZENIT RA Analysegerät Best.-Nr. 41400
  
- ZENIT RA Cuvette Cube \* Best.-Nr. 41402  
Packung mit 960 Küvetten
  
- ZENIT RA System Liquid \* Best.-Nr. 41409  
1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 10x (Systemflüssigkeit).
  
- ZENIT RA Wash Solution \* Best.-Nr. 41407  
1 Flasche mit 0,5 Liter Lösung 20x (Waschlösung).
  
- ZENIT RA Trigger Set \* Best.-Nr. 41403  
1 Flasche mit 250 ml Trigger A (Voraktivierungslösung)  
1 Flasche mit 250 ml Trigger B (Aktivierungslösung)
  
- ZENIT RA D-SORB Solution Best.-Nr. 41436  
Packung mit 2 Flaschen mit je 1 Liter gebrauchsfertiger Lösung.

- ZENIT RA Cartridge Checking System \* Best.-Nr. 41401
- ZENIT RA Top Cap Set Best.-Nr. 41566  
300 Verschlusskappen zum Verschließen der Kalibratorenbehälter nach der ersten Anwendung.

(\*) Das Analysegerät ZENIT RA und die mit einem Sternchen identifizierten Zubehörteile werden von Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgien, hergestellt und von A. Menarini Diagnostics Srl vertrieben.

#### Andere empfohlene Reagenzien

ZENIT RA APS IgG CONTROL SET Best.-Nr. 41450  
3 Fläschchen mit je 1,5 ml Cardiolipin-AK-negativem Humanserum und 3 Fläschchen mit je 1,5 ml Cardiolipin-AK-positivem Humanserum.

#### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

---

Die mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* gelieferten Reagenzien dienen ausschließlich der In-vitro-Diagnostik und dürfen nicht in vivo bei Menschen oder Tieren verwendet werden.

Dieses Produkt ist von professionellen Anwendern unter strikter Beachtung der in diesem Dokument vorliegenden Anweisungen zu verwenden.

Menarini kann nicht für Verluste oder Schäden verantwortlich gemacht werden, die aus einer nicht den mitgelieferten Anweisungen entsprechenden Anwendung entstehen.

#### Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und ist daher wie Infektionserreger enthaltendes Material zu behandeln.

Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlicher Herkunft. Alle für die Herstellung der Reagenzien in diesem Kit verwendeten Serum- oder Plasmaeinheiten wurden mit von der FDA genehmigten Methoden auf das Vorliegen von HBsAg, HCV-Antikörpern, HIV1-Antikörpern und HIV2-Antikörpern untersucht und für nicht reaktiv befunden.

Da jedoch keine Untersuchungsmethode die Abwesenheit von Krankheitserregern garantieren kann, sind alle Materialien menschlicher Herkunft als potentiell infiziert anzusehen und entsprechend zu handhaben.

Falls die Verpackung beschädigt wird und Reagenzien austreten, schützen Sie sich mit einer geeigneten persönlichen Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) und dekontaminieren Sie den betroffenen Bereich mit einer verdünnten Natriumhypochloritlösung.

Entsorgen Sie das für die Reinigung verwendete Material und die von dem Materialaustritt betroffenen Verpackungen gemäß den nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell infizierter Abfälle.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid mit Blei, Kupfer oder verbleitem Messing reagieren und so in den Abflussrohren explosive Azide bilden kann, wird empfohlen, die Reagenzien oder Abfälle nicht in den Abfluss zu entsorgen, sondern die nationalen Vorschriften für die Entsorgung potentiell gefährlicher Abfälle zu befolgen.

#### Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten ist es notwendig, dass Sie sich strikt an diese Gebrauchsanleitung halten und die Angaben in der Bedienungsanleitung des Analysegerätes genau befolgen.

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind nur mit dem Analysegerät *ZENIT RA* zu verwenden.

Die Bestandteile der Reagenzienkartusche können nicht aus der Kartusche entfernt und neu zusammengestellt werden.

Den Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

#### ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

#### LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

---

Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufbewahren.

Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzienkartusche und die Kalibratoren vor dem Öffnen bis zum Verfallsdatum haltbar.

Nach dem Öffnen kann die Reagenzienkartusche 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C oder im Gerät aufbewahrt wird.

Nach dem Öffnen können die Kalibratoren 60 Tage lang angewendet werden, wenn sie im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden und pro Lauf nicht länger als 6 Stunden im Gerät verbleiben.

Reagenzien und Kalibratoren nicht einfrieren.

#### ZUBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

---

Die Bestimmung ist mit humanen Serum- oder Plasmaproben (EDTA - Heparin) durchzuführen.

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer und trüber Proben wird abgeraten.

Wenn die Bestimmung mehr als 8 Stunden nach der Entnahme erfolgt, trennen Sie das Serum von dem Blutklumpen oder das Plasma von den roten Blutkörperchen und füllen Sie die Probe aus den primären Geltrennröhrchen in sekundäre Reagenzröhrchen ohne Zusätze um.

Vor der Untersuchung können die Proben höchstens 7 Tage lang im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Wenn die Bestimmung nach mehr als 7 Tagen durchgeführt wird, sind die Proben einzufrieren (< -20 °C).

Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

---

## VERFAHREN

---

Halten Sie sich genauestens an die Anweisungen in der Bedienungsanleitung des Gerätes, um eine zuverlässige Analyseleistung zu erhalten.

### Einsetzen der Reagenzien

Alle mit dem Kit gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Vor dem Einsetzen der Kartusche in das System muss der Behälter mit den Magnetpartikeln durch horizontales Drehen geschüttelt werden, um die Resuspendierung der Partikel zu erleichtern. Dabei ist die Bildung von Schaum zu vermeiden.

Setzen Sie die Reagenzienkartusche mit Hilfe der entsprechenden Führung in den Reagenzienbereich des Gerätes ein und lassen Sie sie vor der Anwendung mindestens 30 Minuten lang schütteln.

Bei Einsetzen der Reagenzienkartusche wird gleichzeitig deren identifizierender Barcode abgelesen. Falls das Etikett der Kartusche beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Reagenzienkartusche von Hand eingegeben werden.

Das Gerät sorgt automatisch für das kontinuierliche Schütteln der Magnetpartikel.

Wenn die Reagenzienkartusche aus dem Gerät entfernt wird, ist sie bei 2-8 °C aufrecht und im Dunkeln aufzubewahren.

### Einsetzen der Kalibratoren und Kontrollseren

Die Kalibratoren und Kontrollseren des Systems ZENIT RA sind gebrauchsfertig. Lassen Sie die Kalibratoren und Kontrollseren 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und schütteln Sie vorsichtig den Inhalt, von Hand oder mit dem Vortex-Mixer, ohne dass sich dabei Schaum bildet. Den Behälter nicht umdrehen und die Perforationskappe nicht abnehmen (gelbe Kappe für Kalibratoren und grüne oder blaue Kappe für Kontrollseren).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren zum ersten Mal verwendet werden, drücken Sie die Perforationskappe bis zum Anschlag nach unten. Dadurch wird die Membran, die den Behälter versiegelt, perforiert, so dass die enthaltene Flüssigkeit entnommen werden kann. Die Absenkung der Perforationskappe wird angezeigt, indem gleichzeitig der rote Streifen am oberen Ende des Etiketts verdeckt wird (Abb. 1 - „Versiegelter Behälter“ und „Perforierter Behälter“).

Wenn die Kalibratoren oder Kontrollseren bereits verwendet wurden, ist der Behälter mit einer Verschlusskappe (weiße Kappe) versehen, und der rote Streifen des Etiketts ist verdeckt.

In das Gerät dürfen nur Behälter ohne Verschlusskappe (weiße Kappe) und mit verdecktem rotem Streifen des Etiketts eingesetzt werden (siehe Abb. 1 - „Perforierter Behälter“).

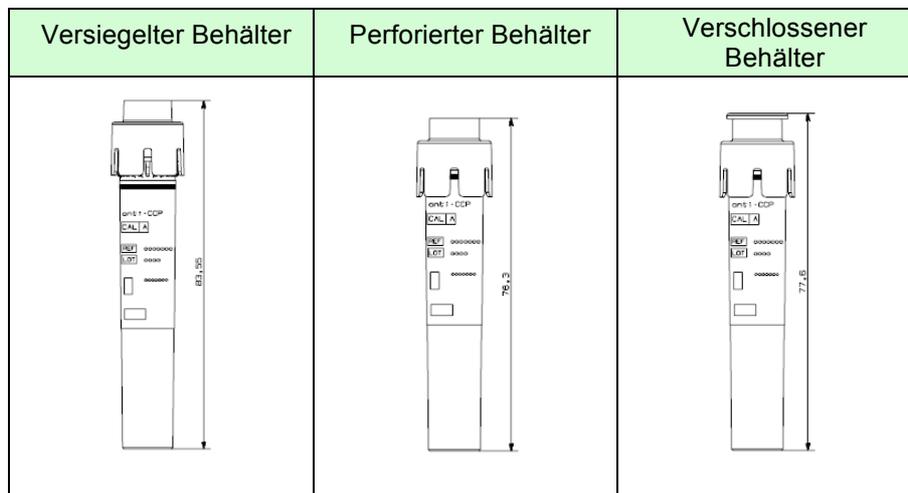
Setzen Sie nach Ablesen des Barcodes die Kalibratoren oder Kontrollseren in den Probenbereich des Gerätes ein. Falls das Etikett beschädigt ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die Daten des Barcodes auch von Hand eingegeben werden.

Die Konzentrationswerte der in den Kalibratoren und Kontrollseren vorliegenden IgG-Antikörper gegen Cardiolipin sind auf der DATA DISK verzeichnet und werden automatisch an das Analysegerät übertragen. Falls die Daten nicht übertragen werden, können sie von Hand eingegeben werden.

Am Ende des Laufs sind die Behälter der Kalibratoren und Kontrollseren mit den dafür bestimmten Verschlusskappen (weiße Kappen) zu verschließen und bis zu ihrer nächsten Anwendung bei 2-8 °C aufzubewahren (Abb. 1 - „Verschlossener Behälter“).

Die Kalibratoren können höchstens viermal verwendet werden.

Abbildung 1: Anordnung der Behälter



### Einsetzen der Proben

Identifizieren Sie die Proben mit Hilfe des Barcodelesers und setzen Sie sie in das entsprechende Fach des Gerätes ein. Falls die Probe nicht mit einem Barcode versehen ist oder der Barcode nicht abgelesen wird, können die identifizierenden Daten der Probe von Hand eingegeben werden.

Wählen Sie für jede Probe die angeforderten Parameter aus.

### Kalibrierung

Das Analysegerät *ZENIT RA* verwendet eine gespeicherte Kalibrierungskurve (Masterkurve), die vom Hersteller für jede Charge der Reagenzienkartuschen erzeugt wird.

Die Parameter der Masterkurve sind zusammen mit den Konzentrationswerten der Kalibratoren auf der DATA DISK gespeichert und werden in die Datenbank des Gerätes übertragen.

Die Kalibratoren A und B werden verwendet, um entsprechend dem verwendeten Gerät und den Reagenzien im Gerät die Masterkurve nachzukalibrieren.

Analysieren Sie zum Nachkalibrieren die beiden Kalibratoren A und B dreifach und die Kontrollseren einfach. Die mit den Kontrollseren erhaltenen Konzentrationswerte ermöglichen es, die neue Kalibrierung zu validieren.

Nachdem die Nachkalibrierung der Masterkurve akzeptiert und gespeichert wurde, können alle nachfolgenden Proben ohne weitere Kalibrierung analysiert werden, es sei den, es tritt einer der folgenden Fälle ein:

- eine Reagenzienkartusche einer neuen Charge wird in das Gerät eingesetzt;
- die Werte der Kontrollseren liegen nicht innerhalb des Akzeptanzbereiches;
- es wurden Wartungsverfahren am Gerät durchgeführt;

- die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve ist abgelaufen.

Die Gültigkeit der nachkalibrierten Masterkurve für den Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* beträgt 15 Tage.

Die Nachkalibrierung wird vom Gerät automatisch verwaltet.

### Quantitative Bestimmung

Drücken Sie die Starttaste.

1. Das System saugt 100 µl Probenverdünnungsmittel, 20 µl Magnetpartikel, 100 µl Probenverdünnungsmittel und 6 µl Probe oder Kontrollserum an (für die Kalibratoren wird das positive Serum mit dem Probenverdünnungsmittel vorverdünnt geliefert, und das entnommene Volumen beträgt 106 µl). Die angesaugten Lösungen und Suspensionen werden in die Reaktionsküvette gegeben.
2. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
3. Nach dieser Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen.
4. In die Küvette werden 200 µl Konjugat gegeben.
5. Die Reaktionsküvette wird 10 Minuten lang bei 37 °C im Karussell inkubiert.
6. Nach dieser letzten Inkubationsphase werden die Magnetpartikel getrennt und gewaschen, und die Küvette wird in die Messkammer überführt.
7. Die in RLU angegebene Menge des an die Festphase gebundenen Konjugats ist direkt proportional zu der Konzentration der in der Probe vorliegenden Cardiolipin-IgG-Antikörper.
8. Die erhaltenen Ergebnisse werden auf die Kalibrierungskurve aufgetragen und in Konzentrationen umgerechnet.

Proben mit Konzentrationswerten über dem oberen Messgrenzwert können verdünnt und erneut getestet werden. Der neue Wert wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert, um das Endergebnis zu erhalten.

### QUALITÄTSKONTROLLE

---

Um die Gültigkeit der Bestimmung zu garantieren, müssen an jedem Tag, an dem dieser Test durchgeführt wird, Kontrollseren mit unterschiedlichen Konzentrationen (mindestens ein negatives und ein positives Serum) gemessen werden.

Falls Ihr Labor für die Überprüfung der Ergebnisse der Bestimmung die häufigere Anwendung oder die Anwendung einer höheren Anzahl von Kontrollseren erfordert, befolgen Sie die im Labor festgelegten Qualitätskontrollverfahren.

Wenn Kontrollseren des Systems ZENIT RA verwendet werden, sind die erwarteten Mittelwerte und die Akzeptanzgrenzen in der auch mit den Kontrollseren gelieferten DATA DISK angegeben.

Falls andere Kontrollseren angewendet werden, sind vor deren Anwendung die mit den Reagenzien und dem System ZENIT RA erwarteten Werte zu bestimmen.

Wenn die Werte der Kontrollseren nicht in den angegebenen Akzeptanzbereich fallen, sind die zugehörigen Testergebnisse nicht gültig, und die entsprechenden Proben müssen erneut getestet werden.

In diesen Fällen ist es vor der Wiederholung der Bestimmung nötig, das Verfahren zur Nachkalibrierung durchzuführen.

## BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

---

### Berechnung der Ergebnisse

Das System berechnet automatisch die Konzentration der in den untersuchten Proben vorliegenden Cardiolipin-IgG-Antikörper. Die Werte können auf dem Bildschirm eingesehen oder ausgedruckt werden.

Die Konzentrationen werden in GPL U/ml angegeben.

Die Konzentration des Analyten in der Probe wird berechnet, indem das erhaltene Ergebnis jeder Probe auf einer Kalibrierungskurve abgelesen wird; letztere wird mittels einer 4-Parameter-Logistic-Fitfunktion erstellt (4PL, Y erwogen) und regelmäßig entsprechend den mit der Bestimmung der Kalibratoren erhaltenen Ergebnisse korrigiert.

Detaillierte Informationen zur Berechnung der Ergebnisse durch das System finden Sie in dessen Bedienungsanleitung.

### Interpretation der Ergebnisse

Der Messbereich des Tests *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* ist: 0,0 - 640 GPL U/ml.

Werte unter 0,0 GPL U/ml sind extrapolierte Werte und können als „gleich 0,0 GPL U/ml“ angegeben werden.

Werte über 640 GPL U/ml können als „über 640 GPL U/ml“ angegeben oder nach geeigneter Verdünnung erneut getestet werden.

Die Ergebnisse der Proben können wie folgt interpretiert werden:

(GPL U/ml)	Interpretation
< 10	Die Probe ist als negativ für das Vorliegen von Cardiolipin-IgG-AK anzusehen.
10-20	Die Probe ist als unsicher für das Vorliegen von Cardiolipin-IgG-Antikörpern anzusehen.
> 20	Die Probe ist als positiv für das Vorliegen von Cardiolipin-IgG-AK anzusehen.

Die obengenannten Werte sind nur vorgeschlagene Werte. Jedes Labor muss seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

## EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

---

Für Diagnosezwecke sind die mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* und dem Analysesystem *ZENIT RA* erhaltenen Ergebnisse zusammen mit anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden klinischen und Labordaten zu verwenden.

Eine bakterielle Verunreinigung der Proben und Wärmeinaktivierung können das Ergebnis der Bestimmung beeinträchtigen.

Heterophile Antikörper in Humanserumproben können mit Reagenzien auf Immunglobulinbasis reagieren und so immunologische In-vitro-Bestimmungen beeinträchtigen. Solche Proben können bei Analyse mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* zu abnormalen Werten führen.

Proben von Patienten mit chronischen Leberkrankheiten, chronischen Infektionen, Kollagenosen und Myelomen mit Hypergammaglobulinämie (IgG-Konzentration über 1800 mg/dl) können in einigen Fällen positive Werte für Antikörper gegen Cardiolipin zeigen.

## ERWARTETE WERTE

---

Es wurden Proben von 100 gesunden Patienten untersucht, um das Vorliegen von IgG-Antikörpern gegen Cardiolipin zu überprüfen.

Alle untersuchten Proben waren negativ, mit einem Mittelwert von 2,5 GPL U/ml und einer Standardabweichung von 2,14 GPL U/ml.

Mit diesen Ergebnissen wurde die Erfassungsgrenze berechnet („Limit of Blank“, LoB = der höchste Wert, der in einer Reihe von Proben ohne den Analyten erwartet werden kann). Die Erfassungsgrenze wurde als das 95. Perzentil der negativen Bevölkerung bestimmt und liegt bei 6,2 GPL U/ml mit der Reagenziencharge 2.

## KLINISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

---

Mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* wurden insgesamt 244 Proben untersucht, darunter 68 Proben von Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom (APS), 46 Proben von Patienten mit rheumatischen systemischen Autoimmunkrankheiten (7 mit Bindegewebserkrankungen, 15 mit systemischem Lupus erythematodes, 24 mit rheumatoider Arthritis), 30 Proben von Patienten mit verschiedenen Infektionskrankheiten (5 mit HIV, 7 mit HBV, 18 mit HCV) und 100 Proben von normalen Probanden.

In der mutmaßlich negativen untersuchten Bevölkerung (46 Proben von Patienten mit rheumatischen systemischen Autoimmunkrankheiten, 30 Proben von Patienten mit verschiedenen Infektionskrankheiten und 100 Proben von normalen Probanden) waren 5 Proben positiv, 6 unsicher und 165 negativ.

- **Diagnostische Spezifität: 93,7 % (165/176)**

In der mutmaßlich positiven untersuchten Bevölkerung (68 Proben von Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom) waren 6 Proben negativ, 4 Proben unsicher und 58 Proben positiv.

- **Diagnostische Sensitivität: 84,4 % (58/68)**

Entsprechend den Ergebnissen der diagnostischen Spezifität und Sensitivität liegt die **diagnostische Übereinstimmung bei 91,4 % (223/244)**.

## LEISTUNGEN

Warnung: Die angegebenen Daten stellen nicht die Funktionsspezifikationen des Kits dar, sondern sind der experimentelle Nachweis dafür, wie der Kit auf die vom Hersteller vorgesehene Art innerhalb dieser Spezifikationen funktioniert.

Präzision und Wiederholbarkeit

Für die Bewertung der Präzision und Wiederholbarkeit des Kits *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP5-A2 der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) verwendet.

Die **Präzision** wurde berechnet, indem die Ergebnisse von 20 Wiederholungen von fünf Seren (ein negatives und vier positive mit verschiedenen Konzentrationen von Cardiolipin-IgG-AK), die mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen während desselben analytischen Laufs untersucht wurden, analysiert wurden.

Die Konzentration des für Cardiolipin-IgG-AK negativen Serums (N4) lag zwischen 0,3 und 2,5 GPL U/ml bzw. zwischen 0,0 und 3,2 GPL U/ml mit den Reagenzienchargen 1 bzw. 2.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 4 positiven Seren.

Probe	Reagenziencharge Nr.	Mittlere Konzentration (GPL U/ml)	SD	VK%
P1	1	24,0	1,12	4,7
	2	22,2	1,05	4,7
P2	1	82,8	2,23	2,7
	2	69,2	1,67	2,4
P3	1	158,7	5,59	3,5
	2	133,4	5,53	4,1
P4	1	341,8	16,53	4,8
	2	286,1	17,88	6,2

Die **Wiederholbarkeit** wurde berechnet, indem die Ergebnisse der einfachen Bestimmung von vier Seren (ein negatives und drei positive mit verschiedenen Konzentrationen von Cardiolipin-IgG-AK), durchgeführt in 30 verschiedenen Läufen mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen, analysiert wurden.

Die Konzentration des für Cardiolipin-IgG-AK negativen Serums (N4) lag zwischen 0,0 und 4,3 GPL U/ml.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3 positiven Seren.

Probe	Mittlere Konzentration (GPL U/ml)	SD	VK%
P1	23,4	2,15	9,2
P2	71,6	5,19	7,2
P3	153,2	16,82	11,0

Linearität der Verdünnungen

Für die Bewertung der Linearität der Verdünnungen des Kits *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* wurde ein Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP6-A der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) verwendet.

Es wurden Verdünnungsreihen von 3 Seren mit hoher Konzentration von Cardiolipin-IgG-AK bestimmt; die Verdünnungen wurden mit dem Probenverdünnungsmittel durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Verdünnungsfaktor	Gemessene Konzentration (GPL U/ml)	Erwartete Konzentration (GPL U/ml)	Wiederfindung %
1	1	201,5	-	(100)
	2	106,4	100,8	105,6
	4	52,8	50,4	104,8
	8	23,9	25,2	94,8
2	1	195,1	-	(100)
	2	102,3	97,6	104,8
	4	50,6	48,8	103,7
	8	21,8	24,4	89,3
3	1	470,6	-	(100)
	2	197,7	235,3	84,0
	4	86,9	117,7	73,8
	8	41,6	58,8	70,7

Es ist darauf hinzuweisen, dass möglicherweise einige Seren bei Messung verschiedener Verdünnungen innerhalb des Messbereiches nicht-lineare Ergebnisse erbringen, da das Ergebnis nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Affinität der in der Probe vorliegenden Antikörper abhängt.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Kits *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG*, die als **Nachweisgrenze** (*Limit of Detection - LoD*, d.h. die geringste Menge des Analyten, die mit der Methode gemessen werden kann) angegeben wird, wurde mit einem Protokoll auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP17-A der Clinical and Laboratory Standards (CLSI) und mit der Gleichung  $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$  bewertet (wobei  $LoB$  die Erfassungsgrenze und  $SD_s$  die geschätzte Standardabweichung der Verteilung der Probe mit niedriger Konzentration ist und  $C_{\beta}$  vom 95. Perzentil der Standard-Gaußverteilung abgeleitet wird).

Es wurden 4 Proben mit niedriger Konzentration des Analyten verwendet, die in 30 verschiedenen Versuchen mit zwei verschiedenen Reagenzienchargen einfach bestimmt wurden.

Als Nachweisgrenze des Kits *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* wurde 10,8 GPL U/ml bestimmt.

Zusammen mit klinischen Überlegungen und den Ergebnissen von Vergleichen mit Referenzmethoden hat der Wert der Nachweisgrenze zur Definition des Cut-Off-Wertes beigetragen.

Analytische Spezifität: Interferenzen

Eine Studie auf der Grundlage der Richtlinien des Dokumentes EP7-A2 des CLSI hat gezeigt, dass das Vorliegen der nachfolgend angeführten, potentiell interferierenden Substanzen in der Probe bis zu den untersuchten Konzentrationen die Leistung des Tests nicht beeinträchtigt.

Potentiell interferierende Substanzen	Höchste untersuchte Konzentration
Freies Bilirubin	20 mg/dL
Konjugiertes Bilirubin	28 mg/dL
Hämoglobin	1000 mg/dL
Fettsäuren	3000 mg/dL

Von der Verwendung lipämischer, hämolytischer oder trüber Proben wird jedoch abgeraten.

Analytische Spezifität: Kreuzreaktionen

Um eventuelle Kreuzreaktionen des für die Sensitivierung der Mikropartikel verwendeten Antigens zu beurteilen, wurde eine Untersuchung mit 26 Proben durchgeführt, die alle hohe Konzentrationen anderer Autoantikörper aufwiesen und negativ für Cardiolipin-IgG-AK waren.

Die verwendeten Proben setzten sich wie folgt zusammen: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), Histon (2), nukleolär (1), Gliadin/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (3), MPO (1), PR3 (1). Die Untersuchung hat keine bedeutsamen Kreuzreaktionen des Antigens in der Festphase mit den anderen Autoantikörpern gezeigt.

Sättigungseffekt bei hohen Konzentrationen

Einige immunologische Methoden können unterschätzte Werte für den Analyten anzeigen (Hook-Effekt), wenn sie zur Bestimmung von Proben mit extrem hohen Analytenkonzentrationen verwendet werden.

Da die von dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* verwendete Methode eine Methode mit zwei Inkubationen ist, ist sie von diesem Effekt nicht betroffen.

Eine Probe mit einer extrem hohen Konzentration (oberhalb des Messbereiches) von IgG-Antikörpern gegen Cardiolipin hat bestätigt, dass bis zu einer Konzentration von 815 GPL U/ml kein Hook-Effekt eintritt.

Relative Sensitivität und Spezifität

Das Vorliegen von IgG-Antikörpern gegen Cardiolipin wurde mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* und einer im Handel erhältlichen ELISA-Methode bestimmt; es wurden 234 Proben verwendet, darunter 64 Proben von Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom (APS), 45 Proben von Patienten mit rheumatischen systemischen Autoimmunkrankheiten, 26 Proben von Patienten mit verschiedenen Infektionskrankheiten und 99 Proben von normalen Probanden.

Bei 6 Proben stimmten die Ergebnisse des ZENIT-RA-Tests und des im Handel erhältlichen ELISA-Tests nicht überein.

Die **relative Übereinstimmung** ist daher 97,4 % (228/234).

Die **relative Sensitivität** ist 95,2 % (60/63).

Die **relative Spezifität** ist 98,2 % (168/171).

#### Kalibrierung und Referenzpräparate

Das System wurde gegen die international anerkannten „HARRIS“-Referenzseren (Produkt-Nr. 6495GM, Chargen-Nr. 021008) kalibriert.

Die im mit 0.5 ml (Proteinkonzentration: 1.1 µg/ml) rekonstituierten Referenzreagenz „Human IgG Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody HCAL 1.1 µg/ml“ (CDC, Best.-Nr. IS2717, Chargen-Nr. 05-0058 09/20/05) nachgewiesene Menge an IgG-Antikörpern gegen Cardiolipin, die mit dem Kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* untersucht wurde, war 55,6 GPL U/ml.

#### LITERATUR

---

1. 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. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid 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* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.
7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.

8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.
9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human  $\beta$ 2-Glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18, 5166-5174.
11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human  $\beta$ 2-glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. *Lancet* 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol*, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *AM J Med*, 1992; 93, 181-186.



**TECHNOGENETICS S.r.l.**  
Viale Casiraghi 471  
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italien

## **AUSTRIA**

### **Vertrieb durch**

A. Menarini G.m.b.H  
Pottendorfer Strasse, 25-27 - A - 1120 Wien  
Tel. +43 1 80 41 5760 - Fax +43 1 80 43 194  
[www.menariniagnostics.at](http://www.menariniagnostics.at)

## **GERMANY**

### **Vertrieb durch**

A. Menarini Diagnostics Deutschland  
Eine Division der Berlin-Chemie AG  
Glienicke Weg 125 - 12489 Berlin  
Tel. +49 30 67 07 30 00 - Fax +49 30 67 07 30 20  
[www.menariniagnostics.de](http://www.menariniagnostics.de)