



**ELISA test til kvantitativ  
bestemmelse af opløselig  
urokinase plasminogen  
aktivator receptor (suPAR)  
i human plasma og serum**

Kode nr. E001 suPARnostic® AUTO Flex ELISA

Der findes oplysninger på andre sprog på vores  
websted: <http://www.virogates.com/>

CE IVD

**ViroGates** 

The ViroGates logo graphic consists of several colorful, multi-segmented lines in shades of green, yellow, orange, and red, arranged in a circular, starburst-like pattern.

Udgave 6.2 DK • SEP 2018

## Monitoring Global Health

Se [www.virogates.com](http://www.virogates.com) for at få de nyeste oplysninger om alle suPARnostic<sup>®</sup>-produkter, instruktioner, software og øvrige værktøjer.

### **ViroGates A/S**

Blokken 45

DK-3460 Birkerød

Denmark

Telefon: +45 2113 1336

E-mail: [info@virogates.com](mailto:info@virogates.com)

[www.virogates.com](http://www.virogates.com)

Anvendelse	4
Sammendrag og forklaring	4
Testprincip	5
Komponenter	6
A. Medfølgende materialer i E001	6
B. Materialer, der er påkrævede, men ikke medfølger	7
C. Opbevaring af komponenter	7
Forholdsregler og anbefalinger vedr. komponenter	7
Indsamling og opbevaring af prøver	8
Testprocedure 1 – fuld plade (dobbel bestemmelse)	8
Beregning af resultater	11
Ydeevne	12
A. Præcision	12
B. Genfinding	13
C. Linearitet	14
D. Detektionsgrænse	14
Testprocedure 2 – Strips (enkelt bestemmelse)	15
Beregning af resultater	18
Ydeevne	19
A. Præcision	19
B. Genfinding	20
C. Linearitet	21
D. Detektionsgrænse	21
Testprocedure 3 – automatiseret ELISA	22
Beregning af resultater	22
Referencer	23

## ANVENDELSE

Dette kit er til *in vitro* diagnostisk brug.

suPARnostic® AUTO Flex ELISA anvendes til kvantitativ bestemmelse af opløselig urokinase plasminogen aktivator receptor (suPAR) i human plasma og serum.

Fortolkning af resultater skal foretages under hensyntagen til patientens kliniske historik og resultaterne af øvrige diagnostiske tests, hvis sådanne er tilgængelige.

suPARnostic® AUTO Flex ELISA kittet med 8 x 12 strips giver fleksibilitet i antallet af testede prøver (op til 91 prøver i enkeltbrønde), eller flere tests udført med ét sæt reagenser.

suPARnostic® AUTO Flex ELISA er designet til at køre på diverse automatiserede ELISA platforme.

## SAMMENDRAG OVER suPAR SOM MARKØR FOR SYG DOMSPROGNOSE

suPAR er den opløselige form af urokinase plasminogen aktivator receptoren (uPAR). Mængden af suPAR er et udtryk for immun aktivering og inflammation. suPAR er målbar i alle kropsvæsker. suPAR er en uspecifik biomarkør og er forhøjet under udvikling (1, 2) eller ved tilstedeværelse af sygdom (3). Jo højere suPAR niveau, jo højere er risikoen for sygdommens udvikling, og desto værre er patientens prognose.

## PRINCIPPER BAG TEST-PROCEDUREN

suPARnostic® er en CE/IVD mærket produktlinie, der anvendes til bestemmelse af opløselig urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) i human EDTA-, heparin-plasma eller serum.

suPARnostic® AUTO Flex ELISA er en forenklet dobbelt-monoklonal sandwich ELISA, hvor prøver og peroxidase-konjugerede anti-suPAR blandes i den medfølgende blandeplade før inkubation i anti-suPAR-præcoatede optiske klare mikrotiterbrønde. Testen gør brug af monoklonale muse- og rotteantistoffer rettet mod human suPAR. suPAR standarden er kalibreret mod en "Golden standard", og alle værdier beregnes tilbage til denne for at sikre, at prøver fra forskellige laboratorier og/eller forskellige testsbatches kan sammenlignes direkte ved brug af suPARnostic® AUTO Flex ELISA kittet. De suPAR-koncentrationer, der bestemmes ved brug af suPARnostic® AUTO Flex ELISA udtrykkes som ng/ml.

I testen blandes suPAR-standardprøverne, kurvekontrolprøverne og patientprøverne med peroxidasekonjugeret anti-suPAR antistof i den medfølgende hvide mikrotiterplade. Denne opløsning overføres derefter fra den hvide plade til den optisk klare brønd, der er præcoatet med capture anti-suPAR antistof. Efter 1 times inkubering dannes der en sandwich bestående af antistof i fast fase, suPAR og peroxidasekonjugeret antistof. Efter vask, der fjerner det ubundne, tilsættes et kromogent substrat til brøndene. Jo mere suPAR, en prøve indeholder, desto mere intens er den blå farve, der udvikles. Efter 20 minutters inkubation i mørke stoppes farveudviklingen ved at tilsætte svovlsyre, der ændrer farven i brøndene til gul. Absorbancen ved 450 nm måles ved brug af en mikrotiter reader. Der udarbejdes en kalibreringskurve fra suPAR-standard, og koncentrationen af suPAR i patientprøven bestemmes ved interpolering.

Resultater med højere værdier end den højeste standard skal fortyndes og måles igen for at få nøjagtige koncentrationer.

# KOMPONENTER

## A. Medfølgende materialer i suPARnostic® AUTO Flex-Kit (kodenr. E001)

(Procedure for automatiseret ELISA-robotter fremgår af side 22.)

Dette kit indeholder tilstrækkeligt med reagenser til 96 tests – op til 91 patientprøver i enkeltbrønde. Mikrotiter strips gør det muligt at udføre så mange eller så få tests, der ønskes. Mindst tre standardprøver, en 0-prøve (Blank) og en kurvekontrolprøve skal indgå i hver testkørsel. Udtag de antal strips der svarer til antal prøver der ønskes testet, og opbevar resten i folieposen, ved. 4°C.

1. **Hvid mikrotiterplade** med 96 brønde til blanding af prøver, standarder, kontrolprøver og prøver med peroxidasekonjugat i en klar plastikpose. Mængde: 1 plade. Forberedelse: Klar til brug.
2. **Klare mikrotiterstrips** præcoatet med anti-suPAR-antistof. 96 testbrønde pr. 12 strips i en aluminiumfolie pose indeholdende tørremiddel. Mængde: 8 brønde x 12 strips. Forberedelse: Klar til brug.
3. **Standarder** Rekombinant suPAR i PBS-buffer med egenudviklet additiver og 0,05 % Bronidox® som konserveringsmiddel. Mængde: 5 standardprøver, hver flaske indeholder 600 µL standardprøve tilsat Proteinstabilisator. Se suPAR koncentrationer i "Analytical Value Sheet" vedlagt Kittet.
4. **Curve Control** Rekombinant suPAR i PBS-buffer med egenudviklet additiver og 0,05 % Bronidox®. Mængde: 1 flaske med 600 µL.
5. **Peroxidase Conjugate** (200 x koncentreret). Peroxidasekonjugeret muse-anti-human suPAR antistof i buffer (indeholdende 50 % ethylenglycol) med egenudviklet additiver og konserveringsmiddel. Mængde: 1 brun flaske med 200 µL. Forberedelse: Afhængig af antal prøver, der skal måles, fortyndes en passende mængde konjugat.  
**Forholdsregler:** Lysfølsom, undgå unødigt eksponering over for lys. Sørg for, at konjugatblandingen bliver brugt inden for 30 minutter efter præparering.
6. **Dilution Buffer** PBS-buffer, pH 7,4, med egen udviklet additiver og 0,05 % Bronidox® som konserveringsmiddel. Mængde: 2 x 18 ml. Forberedelse: Klar til brug.
7. **TMB Solution** 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB). Forholdsregler: Lysfølsom, undgå unødigt eksponering over for lys. Mængde: 2 x 11 ml. Klar til brug. Udtag kun den mængde, der er nødvendig til hver enkelt test (med 10 % ekstra til pipetteringsmargin).
8. **Wash Buffer** 10 x koncentrationen af PBS-buffer med egenudviklet additiver og 0,05 % Bronidox® som konserveringsmiddel. Mængde: 1 flaske indeholdende 100 ml. Forberedelse: Fortynd 1 + 9 (1:10) med destilleret eller deioniseret vand.

9. **Stop Solution** 0,45 M svovlsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Mængde: 16 ml.  
Forberedelse: Klar til brug.
10. **Forseglingstape** Mængde 6 ark.
11. **Tom plastikflaske** til fortynding af konjugatopløsning når der benyttes en hel plade.  
Mængde: 1 flaske. Klar til brug.

## **B. Materialer, der er påkrævede, men som ikke medfølger**

- Justerbar pipette med spidser: 10 -100 µL, 100 -1.000 µL
- Multikanalpipette, 50 - 300 µL
- Reagensreservoirer og/eller små rør til præparering af opløsninger
- Timer
- Deioniseret eller destilleret vand
- Mikrotiterpladelæser med filter til absorptions 450 nm og evt. referencefilter 650 nm for dobbeltbølgelængde aflæsning.
- ELISA-pladevasker, eller ved manuel vask Reagensreservoir og multikanalpipette
- Absorberende papir (kun ved manuel vask).
- Køleskab

## **C. Opbevaring af komponenter**

Opbevar kitkomponenter ved 2-8 °C. Se udløbsdato på etiketterne.

# **FORHOLDSREGLER OG ANBEFALINGER VEDR. KOMPONENTER**

- Til professionelle brugere.
- Brug ikke kitkomponenter, når holdbarheden er udløbet.
- Bland ikke komponenter fra forskellige lots.
- Stopopløsning – komponentnummer 9 – indeholder 0,45 M svovlsyre. Undgå kontakt med hud og øjne.
- Udsæt ikke komponenter for kraftig lys.
- Undgå frysning af kittets komponenter.
- Brug kun de mikrotiterbrønde, der medfølger til kittet.
- Undgå at mundpipettere eller indtage reagenserne.
- Undgå at ryge, spise eller drikke i forbindelse med testning eller i områder, hvor der håndteres prøver eller reagenser.
- Bland ikke prøver fra forskellige patienter eller fra forskellige blodprøver fra den samme patient.
- Humane prøver kan være smitsomme. Undgå at indtage eller indånde aerosoler, og undgå at udsætte huden for dem. Bær beskyttelseshandsker. Prøverne skal bortskaffes på en måde, der er i overensstemmelse med nationale/lokale regler.

# INDSAMLING OG OPBEVARING AF PRØVER

Til fremstilling af plasmaprøver tappes i centrifugeglas indeholdende EDTA eller heparin antikoagulant. Centrifuger blodet ved 3.000 x g i 10 minutter. Serumprøver fremstilles i henhold til anbefalingen fra producenten af blodprøverørene.

Overfør og opbevar prøver i separate, afmærkede glas. Dater og identificer hver enkelt prøve. Ved langtidsoptøring skal temperaturen holdes på -20 °C. Undgå gentagne frysning/optøring.

Groft hæmolyserede, lipæmiske eller mikrobiologisk kontaminerede prøver bør ikke anvendes. Prøver med unormalt forhøjede niveauer af hæmoglobin eller bilirubin kan forstyrre analysens ydeevne og følsomhed.

Vær opmærksom på mulig fortynding af suPAR i forbindelse med transfusion, infusion eller lignende.

*Prøve type*

*Prøve krav*

*Plasma eller Serum*

*Dobbeltbestemmelser: 25 µL; Enkelt bestemmelser: 15 µL*

## TESTPROCEDURE 1 - Fuld Plade (Dobbeltbestemmelse)

suPARnostic® AUTO Flex ELISA (kodenr. E001)

Ækvilibrer alle komponenter til stuetemperatur (18-26 °C) i én time før brug.

Forberedelse af buffere før brug:

### 1. Vaskebuffer, arbejdsopløsning

Fortynd opløsningen 1 + 9 dele (1:10) med destilleret eller deioniseret vand. Hele flasken tilsættes 900 ml destilleret eller deioniseret vand. Arbejdsopløsningen kan opbevares ved 2-8 °C i op til 6 måneder.

### 2. Peroxidasekonjugat, arbejdsopløsning

Forbered konjugatet i den medfølgende tomme plastikflaske. Fortynd 65 µL af Peroxidates Conjugate (komponent 5) i 13 ml af Dilution Buffer (komponent 6). Konjugatet skal beskyttes imod lys og bruges inden for 30 minutter efter præparering.

### Procedure

1. Pipetter 25 µL af hver suPAR-standardflaske (3a til 3e) til kolonnerne A1 – E1, pipetter 25 µL Dilution Buffer til brønd F1 som 0-prøve og 25 µL af kurvekontrollen til brønd G1 i den hvide blandingsplade.
2. Pipetter 25 µL prøve til en brønd i den hvide microtiterplade (brønd H1, A3 – H3, A5 – H5, m.v.).
3. Pipetter 225 µL af peroxidasekonjugatopløsningen (præpareret som ovenfor) i hver af brøndene i den hvide blandingsplade vha. Multikanalpipetten.
4. Bland nænsomt ved langsomt med multikanalpipette, at pipettere indholdet af hver brønd fire gange op og ned i pipettespidsen. Overfør, i duplikat, 100 µL portioner af det blandede indhold fra hver brønd i den hvide blandingsplade til den klare plades brønde ved brug af multikanalpipetten.





5. Påsæt forseglingsstape og inkuber i 1 time ved stuetemperatur (18 - 26 °C) i mørke.
6. Fjern forseglingsstapen, og tøm indholdet fra brøndene.
7. Vask brøndene fem gange med 250 µl pr. brønd med klargjort vaskebuffer. Dette kan udføres med en multikanalpipette eller ved forsigtigt at hælde Vaskebuffer ud over brøndene. Efter tømning af brøndenes indhold skal der pipetteres 250 µL 1X-Vaskebuffer ned i hver brønd. Gentag proceduren yderligere fire gange. Bank let på pladen mellem hvert vasketrin. Placer forsigtigt pladen på absorberende papir efter den sidste vask og sørg for, at der ikke længere er bobler i brøndene. Alternativt benyt en ELISA vasker.

Bemærk: Ukorrekt vask giver fejlagtige resultater. Lad ikke brønde tørre ud mellem inkubationer.

8. Tilsæt 100 µL TMB Solution til hver brønd, påsæt forseglingsstape og inkuber i 20 minutter ved stuetemperatur (18 - 26 °C) i mørke.
9. Fjern forseglingsstapen og stop reaktionen ved at tilsætte 100 µL Stop Solution til hver brønd. Farven skifter fra blå til gul pga. ændringen i pH.
10. Aflæs mikrotiterpladen ved 450 nm inden for 30 minutter efter stop af reaktionen.

Bemærk: Ved brug af Reader med dobbelt bølgelængde kan der bruges et referencefilter ved ca. 650 nm. Kontroller, at der ikke er luftbobler i nogen af brøndene.

## **Sammendrag af testproceduren – Fuld Plade (Dobbeltbestemmelse)**

**Den hvide blandingsplade anvendes i alle følgende trin:**

Tilsæt standarder, kurvekontrol, 0-prøve (blank) og prøver	25 µL/well
Alle brønde: Tilsæt konjugeret arbejdsopløsning og bland, vha. multikanalpipette	225 µL/well
Alle brønde: Overfør vha. multikanalpipette prøver fra den hvide blandeplade til den klare mikrotiterplade.	100 µL/well

**Den klare Mikrotiterplade anvendes i alle følgende trin:**

Inkuber 1 time ved stuetemperatur (18-26°C) i mørke	1 gang
Tøm pladen og vask (250 µL/brønd)	5 cyklusser
Tilsæt TMB Solution vha. multikanalpipette	100 µL/brønd
Inkuber ved stuetemperatur (18-26°C) i mørke	20 minutter
Tilsæt Stop Solution vha. multikanalpipette	100 µL/brønd
Aflæs absorbans	450 nm
Referencefilter, valgfrit	650 nm

## BEREGNING AF RESULTATER

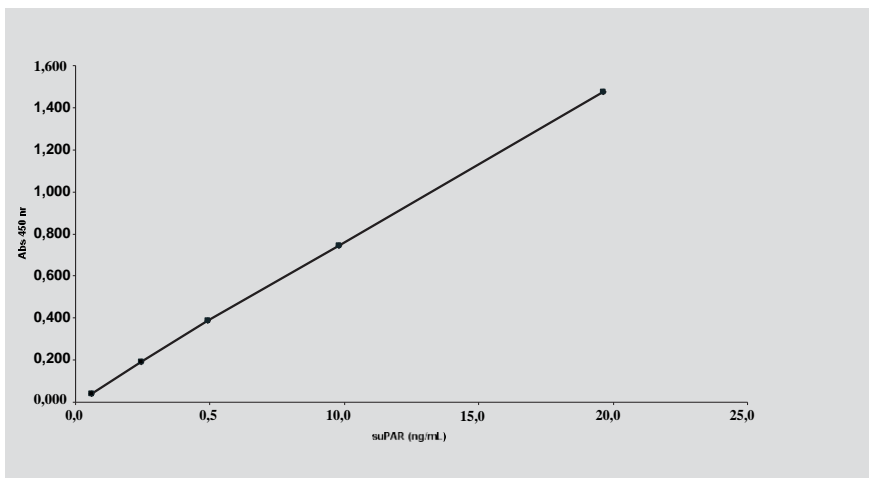
ViroGates har udviklet et program til beregning af suPAR-værdier fra ABS 450 nm værdier. Programmet er gratis og kan downloades på [www.virogates.com](http://www.virogates.com) eller bestilles via e-mail ([info@virogates.com](mailto:info@virogates.com)).

Alternativt beregn den korrigerede absorbans ved at trække absorbansen fra 0-prøven (0 ng/ml). Opret en standardkurve i et lineært koordinatsystem ved at indtaste den korrigerende absorbans fra standarden (ordinat, y-akse) i forhold til den tilsvarende suPAR-koncentration (abscisse, x-akse). Tegn den bedst passende linje (se Figur 1).

Bestem suPAR-koncentrationen for kurvekontrollen og for hver patientprøve igennem interpolering på kurven. Patientprøver, der giver absorbansværdier over standarden, bør fortyndes 1 + 2 med Dilution Buffer (komponent 6) i et reagensglas (medfølger ikke) og derefter gentestes i overensstemmelse med testsproceduren. Efter testen skal resultatet multipliceres med 3 (den ekstra fortyndingsfaktor).

### Kurvekontrol

Den suPAR-koncentration, der er bestemt for kurvekontrollen, bør falde inden for det område, der fremgår af det vedlagte Analytical Value Sheet. I modsat tilfælde skal det undersøges, om årsagen skyldes unøjagtig teknik, ukorrekt håndtering eller nedbrydning af komponent.



Figur 1: Typisk standardkurve

## YDEEVNE.

### A. Impræcision

For hver af fem plasmaprøver blev impræcisionen beregnet fra gennemsnittet af op til otte dobbelte bestemmelser fra op til fem separate kørsler. Standardafvigelse og variationskoefficienter (CV), er angivet i tabellen nedenfor.

Prøve (ng/ml)	Inden for dage CV	Mellem dage CV	Samlet CV	n
2,3	3,5 %	5,1 %	6,0 %	40
2,4	4,7 %	3,5 %	5,6 %	40
3,7	1,3 %	2,3 %	2,4 %	14
5,4	2,1 %	2,2 %	2,9 %	16
7,2	1,7 %	1,7 %	2,3 %	16

## B. Genfinding

Spikede prøver blev fremstillet ved tilsætning af varierende mængder af suPAR til tre plasmaprøver.

Prøve 1 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	-	-	-	
	17,1	13,7	80 %	
	12,1	10,2	84 %	
2,1	7,1	5,4	76 %	89 %
	4,1	3,9	95 %	
	3,1	2,9	94 %	
	2,7	2,5	93 %	
	2,1	2,1	100 %	

Prøve 2 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	22,0	19,9	90 %	
	17,0	14,9	88 %	
	12,0	10,5	88 %	
2,0	7,0	6,2	89 %	94 %
	4,0	4,0	100 %	
	3,0	3,0	100 %	
	2,6	2,6	100 %	
	2,0	2,0	100 %	

Prøve 3 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	-	-	-	
	19,0	16,7	88 %	
	14,0	12,4	89 %	
4,0	9,0	8,0	89 %	95 %
	6,0	5,8	97 %	
	5,0	5,1	102 %	
	4,6	4,6	100 %	
	4,0	4,0	100 %	

### C. Linearitet

Tre plasmaprøver er blevet fortyndet med Dilution Buffer og undersøgt efter fortynding. Den ufortyndede prøve er indstillet til 100 %. Resultaterne er opsummeret i tabellen nedenfor.

Prøve A	Forventet	Fundet	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndede	15,6	15,6	100 %	
80 %	12,4	13,3	107 %	
60 %	9,3	9,4	101 %	102 %
50 %	7,8	8,2	105 %	
40 %	6,2	6,3	102 %	
30 %	4,7	4,6	98 %	

Prøve B	Forventet	Fundet	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndede	10,5	10,5	100 %	
80 %	8,4	8,9	106 %	
60 %	6,3	6,6	105 %	102 %
50 %	5,3	5,4	102 %	
40 %	4,2	4,3	102 %	
30 %	3,2	3,1	97 %	

Prøve C	Forventet	Fundet	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndede	6,8	6,8	100 %	
80 %	5,4	5,5	102 %	
60 %	4,1	4,2	102 %	97 %
50 %	3,4	3,3	97 %	
40 %	2,7	2,5	93 %	
30 %	2,0	1,8	90 %	

### D. Detektionsgrænse

Ved bestemmelse af gennemsnitsabsorbansen + 3 SD for 0-prøven (0 ng/μL) blev detektionsgrænsen for prøven estimeret til at være 0,1 ng/ml.

# TESTPROCEDURE 2 - Stripsmetode (Enkeltbestemmelse)

suPARnostic® AUTO Flex ELISA (kodenr. E001)

Procedure 2 er beregnet til brugere, der kører med mindre end en fuld plade ad gangen. Ækvilibrer alle komponenter til stuetemperatur (18 - 26°C) i én time før brug. Bestem det påkrævede antal brønde på baggrund af både den hvide blandingsplade og den klare microtiterplade. Tag den hvide blandingsplade ud af posen med lynlås. Efter brug skal den hvide blandingsplade lægges tilbage i posen med lynlås af hensyn til fremtidig brug. Klip forsigtigt enden af folieposen, og udtag microtiterpladen fra posen. Læg ubrugte strips tilbage i folieposen, og returner den til opbevaring ved 4°C af hensyn til fremtidig brug. Bemærk: Husk at opbevare den hvide blandingsplade og pladerammen til fremtidig brug!

Forberedelse af buffere før brug:

## 1. Vaskebuffer, arbejdsopløsning

Fortynd opløsningen 1 + 9 dele (1:10) med destilleret eller deioniseret vand. Hele flasken tilsættes 900 ml destilleret eller deioniseret vand. Arbejdsopløsningen kan opbevares ved 2-8 °C i op til 6 måneder.

For hver hel plade skal hele flasken tilsættes til 900 ml destilleret eller deioniseret vand. For hver strimmel, der skal bruges, bør der forberedes mindst 10 ml vaskebuffer. Der vil være behov for mere vaskebuffer, hvis der benyttes en automatisk pladevasker. Arbejdsopløsningen kan opbevares ved 2-8 °C i op til 6 måneder.

## 2. Peroxidasekonjugat, arbejdsopløsning

Forbered den påkrævede mængde konjugat i en ren plastikbeholder af passende størrelse som beskrevet i tabellen nedenfor (ved brug af Dilution Buffer, komponent 6). Ved brug af færre end tre strips anbefales det at tilsætte konjugatet ved brug af en pipette med enkelt kanal. Alternativt benyt en multikanalpipette. Konjugatet bør bruges inden for 30 minutter efter præparering. Ubrugt konjugatopløsning skal beskyttes imod lys og returneres til opbevaring ved 4°C så snart som muligt.

Antal strips	Volumen af konjugatopløsning (µL)	Volumen af Dilution Buffer (mL)
1	15	3
2	20	4
3	25	5
4	30	6
5	35	7
6	40	8
7	45	9
8	50	10
9	55	11
10	60	12
11	65	13
12	70	14

## Procedure

1. Bestem det antal standarder, der skal bruges: fra 3-5 standarder.

**Bemærk: Denne procedure er baseret på 3 standarder.**

2. Beregn antallet af brønde, der er behov for til testen, og mærk dem på den hvide blandingsplade. Overvej at tildække brønde, som ikke skal bruges, med henblik på at forebygge kontaminering af prøver. Efter brug skal den hvide blandingsplade lægges tilbage i posen med lynlås af hensyn til fremtidig brug.
3. Beregn antallet af strips, der er nødvendige til testen. Åbn forsigtigt folieposen og udtag mikrotiterpladen. De overskydende strips returneres til folieposen med tørremiddel, forsegl og returner til opbevaring ved 4 °C af hensyn til fremtidig brug.

Bemærk: Når testen er afsluttet, skal både den hvide plade og rammen gemmes af hensyn til fremtidig brug.

4. Pipetter 15 µL af standardprøverne (3a, 3c og 3e) til brønd A1 – C1 i den hvide mikrotiterplade.
5. Pipetter 15 µL Dilution Buffer (komponent 6) til brønd D1 i den hvide blandingsplade (0-prøve).
6. Pipetter 15 µL af Curve Control (blå hætte) til brønd E1 i den hvide blandingsplade.
7. Pipetter 15 µL af hver prøve til efterfølgende brønde i den hvide blandingsplade efter behov.

Bemærk: Tre standardprøver, 0-prøve og kurvekontrol skal inkluderes i hver test.

8. Pipetter 135 µL peroxidasekonjugatopløsning (præpareret som ovenfor) til hver anvendt brønd. Ved brug af færre end tre strips anbefales anvendelse af en pipette med enkelt kanal. Alternativt benyt multikanalpipette og passende reagensreservoir.
9. Bland nænsomt ved langsomt at pipettere indholdet af hver brønd nogle få gange op og ned i pipettespidsen, og overfør derefter 100 µL til den tilsvarende brønd i de klare strips. Dette kan gøres ved brug af en multikanalpipette. Sørg for, at der bliver skiftet pipettespids mellem hver tilsætning.
10. Påsæt forseglingsstape, og inkuber i 1 time ved stuetemperatur (18 - 26 °C) i mørke.
11. Fjern forseglingsstapen og tøm indholdet fra stripsene.



12. Vask brøndene fem gange med 250 µl pr. brønd med klargjort vaskebuffer. Dette kan udføres med en multikanalpipette eller ved forsigtigt at hælde Vaskebuffer ud over brøndene. Efter tømning af brøndenes indhold skal der pipetteres 250 µL 1X-Vaskebuffer ned i hver brønd. Gentag proceduren yderligere fire gange. Bank let på pladen mellem hvert vasketrin. Placer forsigtigt pladen på absorberende papir efter den endelige vask og sørg for, at der ikke længere er bobler i brøndene. Alternativt benyt en ELISA vasker.

Bemærk: Ukorrekt vask giver fejlagtige resultater. Dette trin skal udføres med forsigtighed. Lad ikke brønde tørre ud mellem inkubationer.

13. Tilsæt 100 µL TMB Solution til hver brønd, tildæk strips med forseglingsstape og inkuber i 20 minutter ved stuetemperatur (18 - 26°C) i mørke.

Bemærk: TMB Solution forurenes let. Fjern kun den påkrævede mængde til prøven fra flasken (herunder 10 % ekstra til pipetteringsmargin). Kasser ubrugt TMB Solution. Må ikke hældes tilbage i flasken.

14. Fjern forseglingsstapen, og stop reaktionen ved at tilsætte 100 µL Stop Solution til hver brønd. Farven skifter fra blå til gul pga. ændringen i pH.
15. Aflæs mikrotiterpladen (strips) ved 450 nm inden for 30 minutter efter stop af reaktionen.

Bemærk: Ved brug af læser med dobbelt bølglængde skal der bruges et referencefilter ved ca. 650 nm. Kontroller, at der ikke er luftbobler i nogen af brøndene.

## Sammendrag af testproceduren – Stripsmetode (Enkeltbestemmelse)

Den hvide blandingsplade anvendes i alle følgende trin:

Tilføj standardprøver, kurvekontrolprøve, 0-prøve og prøver	15 µL/brønd
Alle brønde: Tilsæt konjugeret arbejdsopløsning og bland, vha. multikanalpipette	135 µL/brønd
Alle brønde: Overfør vha. multikanalpipette, pipetter 100 µL/brønd af de blandede prøver fra den hvide blandeplade til mikrotiterpladen (strips).	100 µL/brønd

Mikrotiterpladen (strips) anvendes i alle følgende trin:

Inkuber 1 time ved stuetemperatur (18-26 °C) i mørke	1 gang
Tøm pladen og vask (250 µL/brønd)	5 cyklusser
Tilsæt TMB Solution vha. multikanalpipette	100 µL/brønd
Inkuber ved stuetemperatur (18-26 °C) i mørke	20 minutter
Tilsæt Stop Solution vha. multikanalpipette	100 µL/brønd
Aflæs absorbans	450 nm
Referencefilter, valgfrit	650 nm

## BEREGNING AF RESULTATER

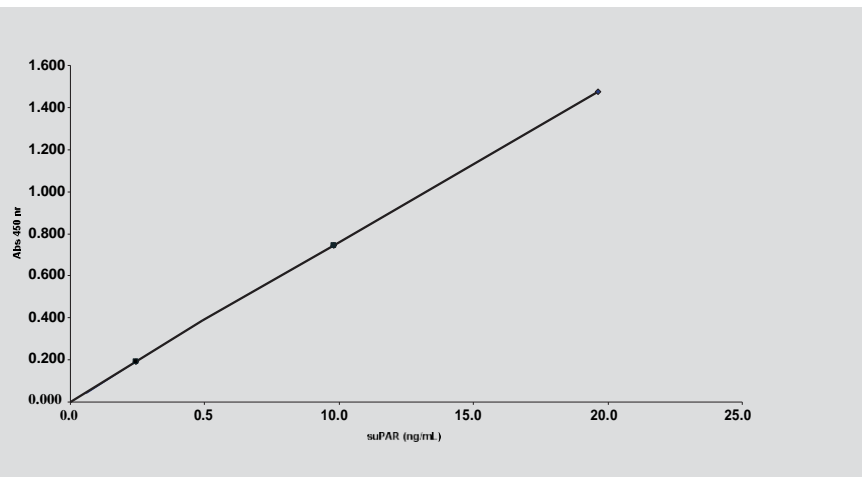
ViroGates har udviklet et program til beregning af suPAR-værdier fra ABS 450 nm værdier. Programmet er gratis og kan downloades på [www.virogates.com](http://www.virogates.com) eller bestilles via e-mail ([info@virogates.com](mailto:info@virogates.com)).

Alternativt beregn den korrigerede absorbans ved at trække absorbansen fra 0-prøven (0 ng/ml) fra alle brønde i testen. Opret en standardkurve i et lineært koordinatsystem ved at indtaste den korrigerende absorbans fra standarden (ordinat, y-akse) i forhold til den tilsvarende suPAR-koncentration (abscisse, x-akse). Tegn den bedst passende linje (se Figur 2).

Bestem suPAR-koncentrationen for kurvekontrollen og for hver patientprøve igennem interpolering på kurven. Patientprøver, der giver absorbansværdier større end største standard, bør forforyndes 1 + 2 med Dilution Buffer (komponent 6) i et reagensglas (medfølger ikke) og derefter gentestes i overensstemmelse med testproceduren. Efter testen skal resultatet multipliceres med 3 (den ekstra fortyndingsfaktor).

### Kurvekontrol

Den suPAR-koncentration, der er bestemt for kurvekontrollen, bør falde inden for det område, der fremgår af det vedlagte Analytical Value Sheet. I modsat tilfælde skal det undersøges, om årsagen skyldes unøjagtig teknik, ukorrekt håndtering eller nedbrydning af komponent.



Figur 2: Typisk standardkurve

## YDEEVNE.

### A. Impræcision

For hver af fem plasmaprøver blev den impræcisionen beregnet på baggrund af op til otte duplikatbestemmelser ved op til fem separate kørsler. Standardafvigelse og variationskoefficienterne (CV) fremgår af tabellen nedenfor. Disse resultater blev genereret ved brug af én standard.

Prøve (ng/ml)	Inden for dage CV	Mellem dage CV	Samlet CV	n
2,3	3,5 %	5,1 %	6,0 %	40
2,4	4,7 %	3,5 %	5,6 %	40
3,7	1,3 %	2,3 %	2,4 %	14
5,4	2,1 %	2,2 %	2,9 %	16
7,2	1,7 %	1,7 %	2,3 %	16

## B. Genfinding

Spikede prøver blev fremstillet ved tilsætning af varierende mængder af suPAR til tre plasmaprøver. Disse resultater er genereret ved brug af kun én standard.

Prøve 1 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	22,12	19,15	87 %	
	17,12	14,21	83 %	
	12,12	10,67	88 %	
2,12	7,12	5,30	74 %	87 %
	4,12	3,92	95 %	
	3,12	2,85	91 %	
	2,72	2,51	92 %	
	2,12	2,12		

Prøve 2 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	21,97	20,17	92 %	
	16,97	15,22	90 %	
	11,97	11,20	94 %	
1,97	6,97	6,52	94 %	96 %
	3,97	3,89	98 %	
	2,97	3,12	105 %	
	2,57	2,66	104 %	
	1,97	1,97		

Prøve 3 ng/ml	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	Genfinding	Gennemsnit
	24,15	21,43	89 %	
	19,15	16,47	86 %	
	14,15	12,14	86 %	
4,15	9,15	8,35	91 %	93 %
	6,15	6,13	100 %	
	5,15	5,18	101 %	
	4,75	4,83	102 %	
	4,15	4,25		

### C. Linearitet

Tre plasmaprøver er blevet fortyndet med Dilution Buffer og undersøgt efter opløsning. Den rene prøve er indstillet til 100 %. Resultaterne er opsummeret i tabellen nedenfor.

Prøve A	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndet	15,3	15,1	99 %	
80 %	12,2	13,6	111 %	
60 %	9,2	9,0	98 %	102 %
50 %	7,6	7,9	103 %	
40 %	6,1	6,4	104 %	
30 %	4,6	4,5	98 %	

Prøve B	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndet	10,4	10,7	103 %	
80 %	8,3	8,6	104 %	
60 %	6,2	6,7	107 %	103 %
50 %	5,2	5,7	109 %	
40 %	4,2	4,4	107 %	
30 %	3,1	2,8	89 %	

Prøve C	Forventet ng/ml	Fundet ng/ml	% fundet	Gennemsnit
Ufortyndet	6,5	6,9	106 %	
80 %	5,2	5,5	105 %	
60 %	3,9	4,0	103 %	98 %
50 %	3,3	3,3	100 %	
40 %	2,6	2,3	88 %	
30 %	2,0	1,7	87 %	

### D. Detektionsgrænse

Ved bestemmelse af gennemsnitsabsorbansen + 3 SD for 0-prøven (0 ng/ $\mu$ L) blev detektionsgrænsen for prøven estimeret til at være 0,1 ng/ml.

## TESTPROCEDURE 3 - automatiseret ELISA

suPARnostic® AUTO Flex ELISA (kodenr. E001)

Procedure 3 er beregnet til brugere, der benytter en automatiseret ELISA-robot til at gennemføre testen. suPARnostic® AUTO Flex-kittet er godkendt til brug sammen med flere forskellige typer kommercielt tilgængelige enheder såsom BEP2000-Roboter og lignende. ViroGates fører løbende protokoller til automatiserede ELISA-Roboter.

Af hensyn til brugbare kørsler på BEP2000 og andre robotter bør der kun benyttes programmer, som er anbefalet af ViroGates. Disse kan bestilles via e-mail ([info@virogates.com](mailto:info@virogates.com)).

Følgende procedure er baseret på BEP2000-robot.

1. Pipetter 325 µL peroxidasekonjugat og derefter yderligere 35 µL Std. A.
2. Afpipetter 350 µL ind i blandepladen. Brug den samme procedure til de resterende standardprøver, 0-prøve og kurvekontrol såvel som prøverne.
3. Pipetter 210 µL Std. A og afpipetter 100 µL til A1 – B1 i den præcoatede klare plade. (Begynd med Std.A og gentag proceduren for de følgende standardprøver, 0-prøve, kurvekontrol og prøver.)
4. Inkuber i 1 time.
5. Udfør 3 x 250 µL vaskecyklusser ved brug af suPARnostic-vaskebuffer, og afslut med aftørring. Udfør ekstra aftørring.
6. Tilsæt 100 µL TMB Solution til alle brønde efterfulgt af 5 sekunders rysten af pladen.
7. Inkuber i 20 min.
8. Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl Stop Solution til alle brøndene.
9. Aflæs pladen ved en bølgelængde på 450 nm.

## BEREGNING AF RESULTATER

De fleste automatiserede ELISA-robotter er i stand til at beregne resultaterne automatisk igennem den medfølgende software. Hvis dette ikke er muligt, bedes du se beskrivelsen på side 18.

# REFERENCER

1. Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts cancer, cardiovascular disease, diabetes and mortality in the general population. Eugen-Olsen J, Andersen O, Linneberg A, Ladelund S, Hansen TW, Langkilde A, Petersen J, Pielak T, Møller LN, Jeppesen J, Lyngbaek S, Fenger M, Olsen MH, Hildebrandt PR, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Haugaard SB. *J Intern Med*. 2010 Sep;268(3):296-308.
2. Soluble Urokinase Receptor and Chronic Kidney Disease. Hayek SS, Sever S, Ko YA, Trachtman H, Awad M, Wadhvani S, Altintas MM, Wei C, Hotton AL, French AL, Sperling LS, Lerakis S, Quyyumi AA, Reiser J. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1916-25.
3. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in acute care: a strong marker of disease presence and severity, readmission and mortality. A retrospective cohort study. J.Rasmussen LJ, Ladelund S, Haupt TH, Ellekilde G, Poulsen JH, Iversen K, Eugen-Olsen J, Andersen O. *Emerg Med* 2016 33(11):769-775.

 **suPAR**nostic<sup>®</sup> by **ViroGates** 

CE IVD