



Enzyme immunoassay til kvantitativ bestemmelse af opløselig urokinase plasminogen aktivator receptor (suPAR) i humant plasma og serum.

Kode no. E001 suPARnostic® AUTO Flex ELISA

For andre sprog se websted: <http://www.virogates.com/>

Dette produkt er beskyttet af en eller flere US, Europæiske og/eller andre udenlandske patenter.

## Supporting Patient Triage

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



ViroGates A/S  
Banevænget 13  
DK-3460 Birkerød Denmark  
Phone: +45 2113 1336  
E-mail: [info@virogates.com](mailto:info@virogates.com) [www.virogates.com](http://www.virogates.com)

## INDHOLDSFORTEGNELSE

|   |    |
|---|----|
| ANVENDELSE .....  | 3  |
| suPAR ER EN MARKØR FOR SYGDOMSFREMGANG .....                          | 3  |
| PRINCIPPER BAG TEST PROCEDUREN .....                                  | 3  |
| KOMPONENTER .....   | 4  |
| FORHOLDSREGLER OG ANBEFALINGER VEDR. KOMPONENTER .....                | 5  |
| INDSAMLING OG OPBEVARING AF PRØVER .....                              | 5  |
| TESTPROCEDURE - Enkeltbestemmelse .....                               | 6  |
| PROCEDURE .....   | 7  |
| SAMMENDRAG AF TESTPROCEDUREN – STRIPSMETODE (ENKELTBESTEMMELSE) ..... | 9  |
| BEREGNING AF RESULTATER .....   | 9  |
| YDELSESEGENSKABER .....   | 10 |
| A. Unøjagtighed .....   | 10 |
| B. LOB, LOD, LOQ .....  | 10 |
| C. Hook effect .....  | 11 |
| HÅNDBLÆNING AF AFFALD .....   | 11 |
| REFERENCER .....  | 11 |

## 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 humant 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 det antal af prøver der kan testes af gangen (op til 91 prøver i enkeltbestemmelse), sat at samt antallet af test gange udført med det samme sæt reagenser.

### **suPAR ER EN MARKØR FOR SYGDOMSFREMGANG**

suPAR er den opløselige form af urokinase plasminogen aktivator receptoren (uPAR). Mængden af suPAR er et udtryk for immun aktivering og inflammation.<sup>1</sup> suPAR er en uspecifik biomarkør og er forhøjet under udvikling eller ved tilstedeværelse af sygdom. suPAR har en høj negative prædiktive værdi for at udelukke sygdomsprogression. Dette betyder, at patienter med et lavt (<3 ng / ml) suPAR niveau har en god prognose og en lav risiko for genindlæggelse og dødelighed<sup>3</sup>, hvilket understøtter beslutningen om udskrivning af patienten. Et højt suPAR-niveau (>6 ng / ml) er et stærkt mål for kronisk inflammation og den underliggende risiko for negative resultater, herunder kortvarig dødelighed (på hospital, 30 dage eller 90 dage)<sup>2</sup>, der understøtter beslutningen om yderligere undersøgelse af patient.

### **PRINCIPPER BAG TEST PROCEDUREN**

suPARnostic® er en CE/IVD mærket produkt linje, 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 blande-plade 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 testbatches 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. Absorbansen 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.

## KOMPONENTER

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

Dette kit indeholder tilstrækkeligt med reagenser til 96 tests – op til 91 patientprøver i enkeltbestemmelse. Mikrotiter strips gør det muligt af udføre så mange eller så få tests, der ønskes. Mindst tre standardprøver, en 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<sup>®</sup> som konserveringsmiddel. Mængde: 5 standardprøver, hver flaske indeholder 400 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<sup>®</sup>. Mængde: 1 flaske med 400 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 120 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 egenudviklet additiver og 0,05 % Bronidox<sup>®</sup> som konserveringsmiddel. Mængde: 1 x 30 ml. Forberedelse: Klar til brug.
7. **TMB Solution** 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB).  
Forholdsregler: Lysfølsom, undgå unødigt eksponering over for lys. Mængde: 1 x 15 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<sup>®</sup> 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 4 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 absorbans 450 nm og evt. referencefilter 650 nm for dobbeltbølgelængde aflæsning (450-650nm).
- ELISA mikropalder vasker, klemme flaske eller egnet beholder til vask af brønde
- Absorberende papir
- 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 kraftigt 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.

**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 langtidsopbevaring skal temperaturen holdes på -20 °C. Undgå gentagne frysning/optøning.

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*

Plasma eller Serum

*Prøve krav*

Enkelt bestemmelser: 15 µL

## TESTPROCEDURE - Enkeltbestemmelse

suPARnostic<sup>®</sup> AUTO Flex ELISA (# E001)

Ækvilibrer alle komponenter til stuetemperatur (18 - 26°C) i 1 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:

### Vaskebuffer, arbejdsopløsning

- Fortynd den nødvendige mængde af arbejdsopløsningen 1 + 9 dele (1:10) med destilleret eller deioniseret vand. Benyttes hele pladen skal der til hele flasken med arbejdsopløsningen tilsættes 900 ml destilleret eller deioniseret vand. Arbejdsopløsningen kan opbevares ved 2-8 °C i op til 6 måneder. For hver strip, der skal bruges, skal der fremstilles mindst 10 ml vaskebuffer. Der kræves mere vaskeopløsning, hvis der anvendes en automatisk pladevaskemaskine.

### Peroxidasekonjugat, arbejdsopløsning

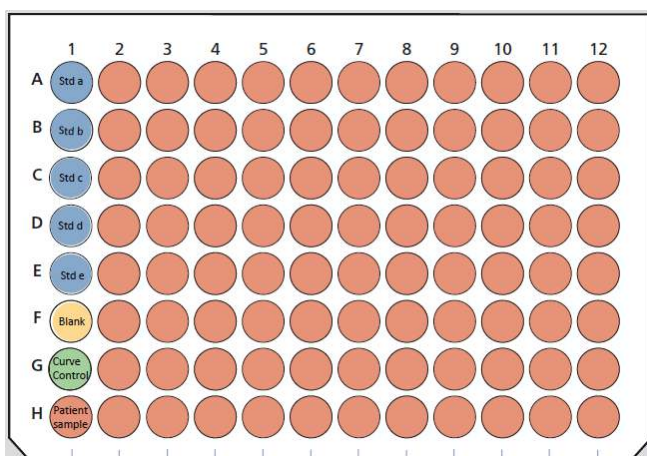
- Forbered den påkrævede mængde konjugat i en ren plastikbeholder af passende størrelse som beskrevet i tabellen nedenfor (ved brug af Dilution Buffer, komponent 6). Ved brug af færre end tre strips anbefales det at tilsætte konjugatet ved brug af en pipette med enkelt kanal. Alternativt benyt en multikanalpipette.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

| Antal strips | Volumen af konjugateopløsning (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                              |

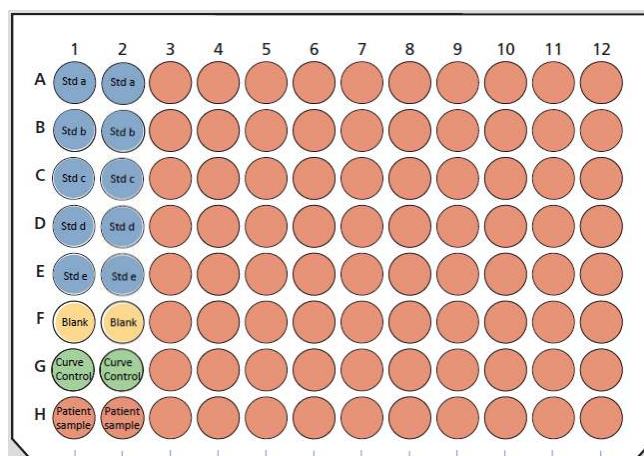
Table 1. Volumet af Dilution Buffer og konjugate opløsning der skal bruges til at lave konjugate mix afhængig af antallet af strips der benyttes.

## PROCEDURE

- Bestem det antal standarder, der skal bruges: fra 3-5 standarder.  
**Bemærk:** Denne procedure er baseret på 5 standarder.
- 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.
- 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.
- Pipetter 15 µL af standardprøverne (3a, 3b, 3c, 3d og 3e) til brønd A1 – E1 i den hvide microtiterplade. Det anbefales at lave standardprøverne i duplikater.
- Pipetter 15 µL Dilution Buffer (komponent 6) til brønd F1 i den hvide blandingsplade (Blank). Det anbefales at lave den blanke prøve i duplikat.
- Pipetter 15 µL af Curve Control (blå hætte) til brønd G1 i den hvide blandingsplade. Det anbefales at den laves i duplikat.
- Pipetter 15 µL af hver prøve til efterfølgende brønde i den hvide blandingsplade efter behov. Det anbefales at lave prøver i duplikater.  
**Bemærk:** standardprøver, Blank og kurvekontrol skal inkluderes i hver test.



Figur 1 general opsæt af ELISA plade der viser distribuering af Standard, kurve kontrol, Blank og prøver i singles.



Figur 1 general opsæt af ELISA plade der viser distribuering af Standard, kurve kontrol, Blank og prøver i duplikater.

- Pipetter 135 µL peroxidasekonjugat opløsning (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 3 gange med 250 µl pr. brønd med klargjort vaskebuffer. Dette kan udføres med en multikanalpipette. Efter tømning af brøndenes indhold skal der pipetteres 250 µL 1X-Vaskebuffer ned i hver brønd. Gentag proceduren yderligere 2 gange.  
Bank let på pladen mellem hvert vasketrin ved at placere pladen forsigtigt 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 bølgelængde 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, Blank og prøver  | 15 µL/brønd  |
| Alle brønde:<br>Tilsæt konjugeret arbejdsopløsning* og bland, vha. multikanalpipette   | 135 µL/brønd |
| Alle brønde:<br>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 time       |
| Tøm pladen og vask (250 µL/brønd)                    | 3 gange      |
| Tilsæt TMB Solution vha. multikanalpipette *         | 100 µL/brønd |
| Inkuber ved stuetemperatur (18-26 °C) i mørke        | 20 minutter  |
| Tilsæt Stop Solution*                                | 100 µL/brønd |
| Aflæs absorbans                                      | 450 nm       |
| Referencefilter, valgfrit                            | 650 nm       |

\* Brug en 8-kanals pipette

## 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 Blank prøve (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 (absdiscisse, x-akse). Tegn den bedst passende linje (se Figur 2).

Bestem suPAR-koncentrationen for kurvekontrollen og for hver patientprøve igennem interpolering på kurven. Det anbefales ikke at fortynde prøver.

### 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.

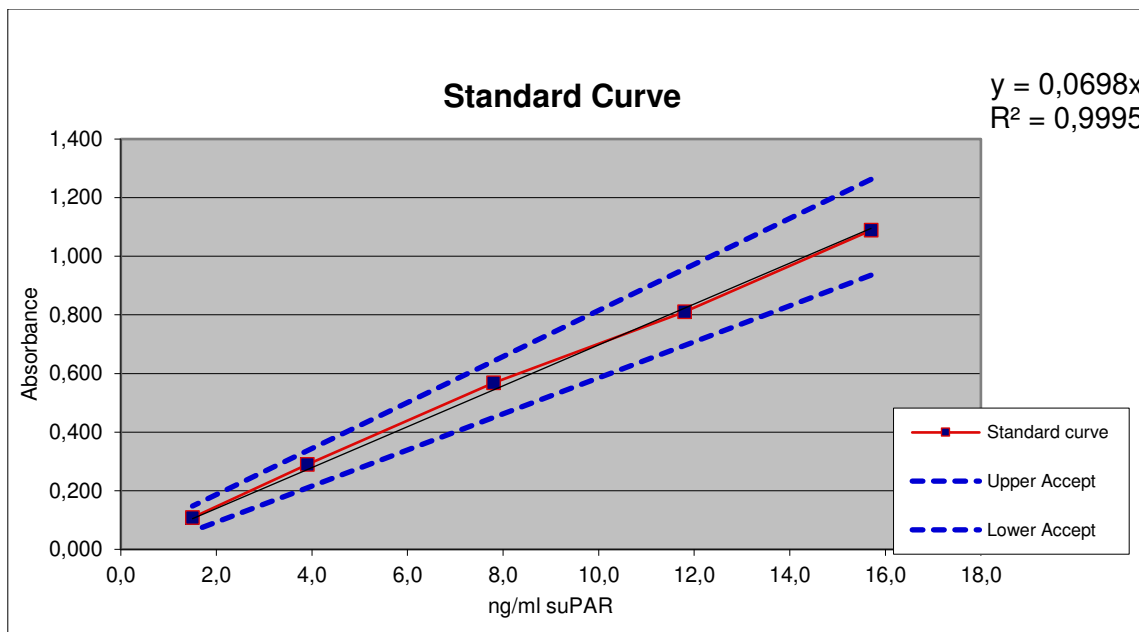


Figure 2 Typisk Standardkurve

### YDELSESEGENSKABER

#### A. Unøjagtighed

For hver af fem plasmaprøver blev unøjagtigheden 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) | Indenfor 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. LOB, LOD, LOQ

Grænsen for Blank (LOB) viser variationen af Blanke prøver. Her er det en blanding af humant plasma fortyndet ned fortyndings buffer i 1+15 ratio.

**LOB = 0.1 ng/mL**

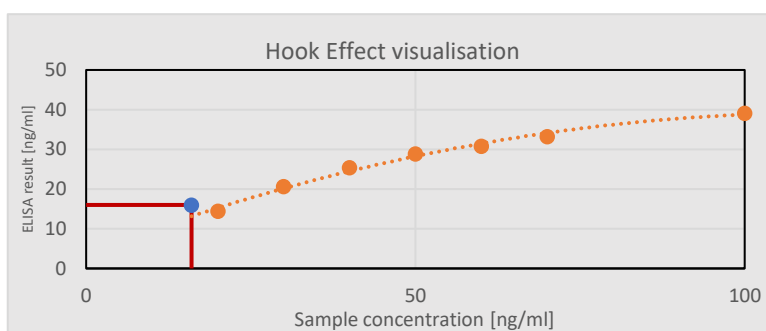
Detektionsgrænse (LOD) er den laveste koncentration af suPAR som kan måles og som ikke er en Blank prøve.

**LOD = 0.4 ng/mL**

Kvantificeringsgrænse (LOQ) er den laveste suPAR koncentration, der ikke kun kan påvises pålideligt, men hvor nogle foruddefinerede mål for bias og upræcision er opfyldt. LOQ kan være den samme som LOD eller højere

**LOQ = LOD**

### C. Hook effect



Observation: Der er ingen observeret hook effekt op til 100 ng/ml suPAR koncentration i spiket humant plasma.

Bemærk: suPAR-koncentrationer i området fra 0-500 ng/ml blev målt. Afbildet ovenfor er området fra 0-100 ng/ml.

Resultater for 200 og 500 ng/ml var stabile ved maksimalt niveau på ca. 40 ng/ml. Dette er begrænsningen af ELISA og pladelæserens ydeevne, fordi maksimal OD for prøver efter TMB- og STOP-opløsningstrin er 3,0 (1,0 er etableret til 15 ng/ml).

### HÅNDTERING AF AFFALD

Ubrugte reagenser og affald bortskaffes i henhold til nationale og lokale retningslinjer.

### REFERENCER

1. Desmedt S, et al. The intriguing role of soluble urokinase receptor in inflammatory diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017 Mar;54(2):117-133
2. Rasmussen LJH, et al. Combining National Early Warning Score with Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) Improves Risk Prediction in Acute Medical Patients: A Registry-Based Cohort Study. *Crit Care Med.* 2018 Dec; 46:1961-8.
3. Rasmussen LJ, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in acute care: a strong marker of disease presence and severity, re-admission, and mortality. A retrospective cohort study. *Emerg Med J.* 2016 Nov; 33:769-75.