

LABELING

Title: **REAADS IgM ANTI-PROTHROMBIN
PACKAGE INSERT**

Document Number: 10294

Supersedes/Date: 2007-04-12

CO No.: 07-0630

Revision: 08

QA Approval/Date: K.Hassler 2007-11-07

Effective Date: 2008-01-11

Dimensions: Flat 8½" wide X 11" long

Folded / Booklet Format 5 ½" X 8 ½"

Colors: Black Text

Paper Stock: White

REAADS[®]
IgM Anti-Prothrombin Semi-Quantitative Test Kit

For *In Vitro* Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semiquantitative determination of IgM anti-prothrombin (aPT) antibodies in human serum or citrated plasma (3.2% sodium citrate).

INTENDED USE

For the detection and semi-quantitation of IgM antiprothrombin (aPT) antibodies in individuals with systemic lupus erythematosus (SLE) and lupus-like disorders (e.g., antiphospholipid syndrome).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ANTI-PROTHROMBIN TEST

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous group of immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) that bind to several anionic phospholipids (e.g., cardiolipin, phosphatidylserine), to phospholipid-protein complexes, and to certain proteins (cofactors) in the absence of anionic phospholipids.¹⁻³ Several plasma proteins, mostly associated with the coagulation system and with strong phospholipid binding properties, have been identified as antiphospholipid cofactors. Beta 2 glycoprotein I (β_2 GPI) and prothrombin are the most common and extensively studied antiphospholipid cofactors.⁴⁻⁶ Most autoimmune antiphospholipid antibodies, which are strongly associated with thrombosis, require a cofactor for optimal interaction with the antigen. The epitope responsible for this interaction is localized on the cofactor molecule.^{7,8} Anti- β_2 GPI antibodies have been shown to be more specific for thrombosis than anti-cardiolipin (aCL) antibodies.⁹⁻¹¹ Many clinical laboratories now include the detection of cofactor antibodies (e.g., anti- β_2 GPI) as part of their diagnostic panel for the evaluation of antiphospholipid antibodies. More recently, antibodies to the other protein cofactor (prothrombin) have been reported in patients with the antiphospholipid syndrome (APS)¹² and have been proposed to be included in the serologic evaluation of antiphospholipid antibodies. Clinically, elevated serum levels of these antibodies are associated with an increased risk for APS, characterized by recurrent arterial or venous thrombosis, thrombocytopenia, and/or fetal loss. APS may be found in patients with autoimmune diseases (e.g., SLE or secondary APS) as well as in individuals without an obvious underlying disease (primary APS).^{1,13,14}

Antiphospholipid antibodies are classified according to the laboratory method used for their detection. Lupus anticoagulants (LA) are a group of antiphospholipid antibodies that inhibit phospholipid-dependent coagulation assays. LAs have been shown to correlate better with thrombosis (APS) than classic antiphospholipid ELISA assays (e.g., anticardiolipin and anti-phosphatidylserine).¹⁵ LAs also require protein cofactors (β_2 GPI or prothrombin) for optimal immunologic binding.¹⁶ The majority of LA samples contain both antibodies (anti- β_2 GPI and anti-prothrombin) which have been identified as responsible for the LA activity.¹⁷ However, it is not infrequent to find LA positive samples that contain only anti-prothrombin (aPT) antibodies. Galli and collaborators^{18,19} described different coagulation profiles for samples containing anti- β_2 GPI or aPT antibodies. LA activity defined by an abnormal kaolin clotting time (KCT) seems to be caused by aPT antibodies while LA activity defined by an abnormal dRVVT clotting time seems to be caused by anti- β_2 GPI antibodies. Furthermore, patients with these abnormal clotting profiles showed different incidence of thrombosis.²⁰ The exact pathogenic role of aPT antibodies in thromboembolic disease and as a serologic marker for assessing APS is now under intensive investigation.²¹⁻²³

The REAADS anti-prothrombin (aPT) ELISA test kit uses purified human prothrombin as antigen in a well-known ELISA format to detect IgM anti-prothrombin antibodies in human serum or citrated plasma in the absence of other exogenous cofactors or phospholipids. High serum or plasma levels of aPT antibodies may add valuable information in the laboratory assessment of antiphospholipid antibodies.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum or citrated plasma samples, calibrator, and controls are incubated in microwells coated with purified human prothrombin. Incubation allows the anti-prothrombin antibodies present in the samples to react with the immobilized antigen. After the removal of unbound proteins by washing, antibodies specific for human IgM labeled with horseradish peroxidase (HRP) are added forming complexes with the prothrombin bound antibodies. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of a single solution containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the concentration of anti-prothrombin antibodies.

Results are obtained by reading the optical density (O.D. or absorbance) of each well in a spectrophotometer. Calibrator sera are provided with the IgM anti-prothrombin antibody concentration expressed in M units. The user has the option of running either a single point calibrator or a four-point calibration curve. For single point calibration, dividing the concentration value of the calibrator sera by the O.D. value of the calibrator provides a conversion factor. The O.D. values of the other samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgM anti-prothrombin antibody concentrations in M units. For multipoint calibration, perform a linear regression analysis with calibrator values against calibrator O.D.'s. Controls and patient results are determined from the calibration curve.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS IgM anti-Prothrombin 96-microwell Test Kit contains the following reagents (volumes may vary depending on the kit size and configuration):

- 12 x 8 Stabilized Prothrombin (human) coated microwells with Frame
- 60 mL Sample Diluent II (blue-green solution)
- 3 vials (0.25 mL each) IgM anti-Prothrombin Calibrator (1- high, 2-moderate, 3-low)(human); see vial label for antibody concentration in M units.* Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 0.25 mL IgM anti-Prothrombin Positive Control (human); see vial label for expected M unit range*
- 0.25 mL Normal Control (human); see vial label for expected M unit range*
- 15 mL anti-Human IgM (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution)
- 15 mL One-Component Substrate Solution; contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 0.01% hydrogen peroxide in acidic buffer
- 15 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid)
- 2 bottles (30 mL) Wash Concentrate (33X PBS/Tween)



***CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use

1. Human source materials used to prepare the calibrator and controls included in this kit have been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV and HIV 1 & 2 by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Certain components of this product contain sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.

6. One-component substrate can cause irritation to the eyes and skin. Use gloves, eye protection, and lab coat when handling. Wash hands thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
7. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Irritant  Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or citrated plasma (3.2% sodium citrate) should be used as the sample matrix. Blood should be collected by venipuncture and the serum separated from the cells by centrifugation after clot formation.

If citrated plasma is to be used, blood should be collected by venipuncture and the plasma separated from the cells immediately by centrifugation at 1500g for 10 minutes. The supernatant must be carefully removed after centrifugation to avoid contamination with platelets. Repeating the centrifugation and separation steps may be advisable to minimize platelet contamination. Lysed or aged platelets can lead to aberrant results.

If not tested immediately, the specimen should be stored at 2 to 8°C. If specimens are to be stored for more than 72 hours, they should be frozen at -20°C or below. Avoid repeated freezing and thawing. Do not use hemolyzed, icteric, or lipemic serum or plasma as these conditions may cause aberrant results. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

REAADS IgM anti-Prothrombin Test Kit; see “Reagents,” section for a complete list.

Materials Required but not Supplied:

- Reagent grade water to prepare wash solution (2L) and to zero or blank the plate reader during the final assay step
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 µL and 1000 µL, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for handling small volumes
- Flasks or bottles, 1 L
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semiautomated washing system
- Disposable gloves
- Plate-reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (650 nm reference if dual beam)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously
- Microdilution tubes and a 96-well microdilution tube holder for sample dilutions and rapid delivery to microwell plate

Procedural Notes

1. Bring serum or plasma samples and kit reagents to room temperature and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage as soon as possible.
2. All dilutions of the calibrator, controls, and test sera or plasma must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well can be included in each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 µL of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to “zero” or “blank” against air or a water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated plate washing system can also be used.

5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual wash solution can cause inconsistent color development of the Substrate Solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering 100 μ L each to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Carefully controlled timing of all steps is critical. All calibrators, controls, and samples must be added within a five-minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18° to 26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid microbial and cross-contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use kit components beyond expiration date.
13. Do not mix or use kit components from different kit lot numbers.

REAGENT PREPARATION

Wash Solution (PBS/Tween): Measure 30 mL of wash concentrate and dilute to 1 L with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused wash solution in the refrigerator at 2-8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or cross-contamination.

Assay Procedure

1. The assay can be performed with a single point calibration (Calibrator 2) or a four-point calibration curve (Calibrators 1, 2, and 3 plus sample diluent/reagent blank as Calibrator 4 equal to 0 M units). A reagent blank control should also be run with the single point calibration method. Sample Diluent without serum or plasma is added to the well. This well will be treated the same as a control or patient sample in subsequent assay steps.
2. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
3. Prepare a 1:51 dilution of the calibrators, controls, and patient samples in sample diluent (blue-green solution); e.g., 10 μ L sample added to 500 μ L sample diluent equals a 1:51 sample dilution. Mix well.
4. Add 100 μ L of diluted calibrators (including the reagent blank/Calibrator 4), controls, and patient sample(s) to the appropriate microwells.
5. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells. To retain microwells during inversion and washing, squeeze the frame along the longer sides.
6. Wash 4 times with wash solution. Completely fill each well with wash solution. Invert the microwells to empty the fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. Repeat the process three additional times. Invert the wells on absorbent paper and tap to blot residual wash solution. Do not allow the wells to dry out at any time.
7. Add 100 μ L anti-Human IgM HRP-Conjugated Antibody Solution (red) to the wells.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump the conjugate solution.
9. Wash 4 times with wash solution, as described in step 6. Do not allow the wells to dry out.
10. Add 100 μ L One-Component Substrate Solution to each well and incubate for 10 minutes at room temperature. Add substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
11. Add 100 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add the acid to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue Substrate will turn yellow and colorless solution will remain colorless. Blank or zero the plate reader against air or a water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm (and 650 nm reference if dual beam). The O.D. values should be measured within 5 minutes of the addition of the Stopping Solution.

Results

Single Point Calibration

1. Calculate the mean O.D. reading if duplicates of Calibrator 2, Controls, and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on vial label) by its O.D. or mean O.D. reading to obtain the conversion factor.
3. Multiply the O.D. or mean O.D. reading for each of the controls and patient samples by the conversion factor to obtain an anti-prothrombin (aPT) antibody concentration value expressed in M units.

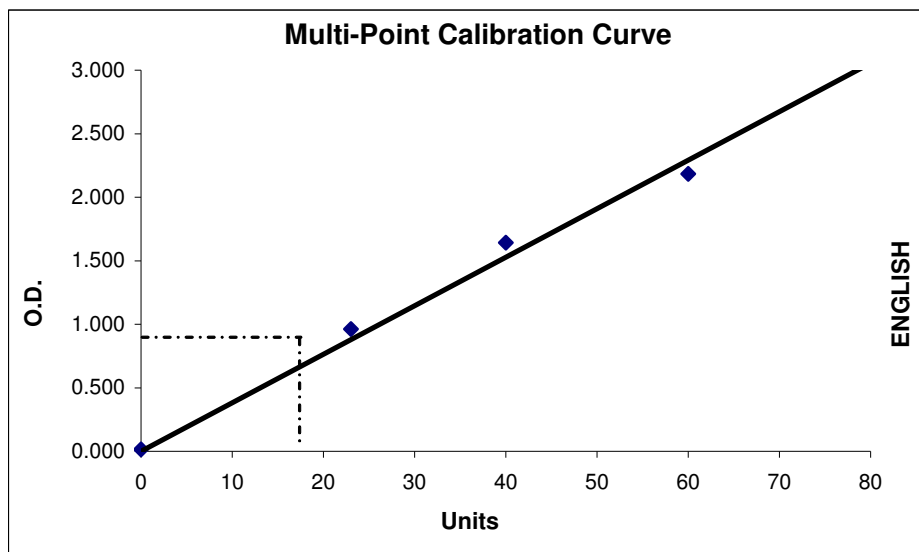
Conversion Factor	=	$\frac{\text{IgM aPT Concentration of Calibrator 2 (in M units)}}{\text{O.D. or Mean O.D. Reading of the Calibrator 2}}$
IgM aPT Concentration of Sample	=	Conversion Factor X O.D. or Mean O.D. of the Sample

4. The Conversion Factor must be calculated for each assay run. Using a Conversion Factor from another assay will invalidate the results.

MULTI-POINT CURVE CALIBRATION

1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of the calibrators, controls and patient samples were performed.
2. Perform linear regression analysis with the four calibrator values (See vial labels for M units. Calibrator 4 [sample diluent] is equal to 0 M units) against the O.D.'s for each calibrator.
3. The calibrator curve can be plotted either automatically using a validated software program or manually with graph paper. It is recommended to use a zero intercept when generating the regression line to avoid negative values. If this option is not available, any negative values should be reported as zero units. When generating the curve manually, draw a best fit line through the plotted points using a zero intercept.
4. Determine the control and patient sample values from the calibrator curve.

For Example:



Using the example calibration curve provided, a specimen O.D. of 0.860 at 450 nm would correspond to a calculated value of 26.2 units. The calibration curve provided is an example only and should not be used to calculate patient results. A new calibration curve should be performed with every test run.

Quality Control

1. The O.D. reading of the Calibrator 2 should be ≥ 0.600 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator 2 O.D. readings of less than 0.600 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
2. The O.D. of Calibrator 4 or reagent blank should be less than 0.100 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.100 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The anti-prothrombin (aPT) values obtained for the control samples should be within the ranges indicated on the vial labels. Occasional small deviations outside these ranges are acceptable.
4. O.D. readings for duplicate wells of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. reading for that sample if the absorbance readings are greater than 0.200.
5. Each laboratory should determine its own normal cut-off values for the appropriate population of patients.
6. Samples with anti-prothrombin (aPT) values greater than 100 M units may be reported as “greater than 100 M units.”
7. Ensure that all quality control parameters have been met before reporting test results.

NORMAL RANGE

Serum and citrated plasma (3.2% sodium citrate) samples from 100 healthy blood donors were tested for IgM antiprothrombin (aPT) antibodies. The following normal range was established:

- Less than 20 M units

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Normal Serum Samples:

Serum samples from 100 healthy blood donors were assayed for the presence of IgM anti-prothrombin (aPT) antibodies on three lots of REAADS IgM aPT ELISA test kit. Using the established cut-off value of 20 M units, this normal serum population demonstrated 97% specificity (mean value = 7.9 M units, SD = 6.0).

Normal Plasma Samples:

Citrated plasma (3.2% sodium citrate) samples from 100 healthy blood donors were assayed for the presence of IgM anti-prothrombin (aPT) antibodies on two lots of REAADS IgM aPT ELISA test kit. Using the established cut-off value of 20 M units, this normal plasma population demonstrated 97% specificity (mean value = 6.3 M units, SD = 4.3).

Diseased Serum Samples:

Serum samples from 42 infectious disease (syphilis), 10 Osteoarthritis (OA), 42 progressive systemic sclerosis (PSS), and 42 rheumatoid arthritis (RA) patients were assayed for the presence of IgM anti-prothrombin (aPT) antibodies on REAADS IgM aPT ELISA test kit. These patient groups demonstrated statistically similar results compared to the healthy blood donor population (mean values = 10.3, 8.4, 11.2, and 10 M units respectively). Results are summarized in the table below.

Serum Samples	Healthy	Infectious (Syphilis)	Osteo-arthritis (OA)	PSS	RA
# of Samples (n)	100	42	10	42	42
Mean Value \pm SD (M units)	7.9 \pm 6.0	10.3 \pm 8.3	8.4 \pm 5.4	11.2 \pm 7.8	10 \pm 7.1
% Negative (Specificity)	97%	88.1%	90%	90.5%	95.2%

Clinical Sensitivity

Autoimmune Disease:

Serum samples from a group of 40 patients with autoimmune diseases were selected for their positive reactivity to antiphospholipid antibodies and included some patients with SLE and clinical manifestations suggestive of the antiphospholipid syndrome. These serum samples were tested for the presence of IgM aPT antibodies on REAADS IgM aPT ELISA test kit. Using the cut-off of 20 M units, 45% of the samples reacted positive for IgM aPT antibodies (mean value = 23.5 M units, SD = 19.3). The mean IgM aPT value of this population was statistically different from the healthy blood donors ($p < 0.001$).

Systemic Lupus Erythematosus (SLE):

Serum samples from 41 unselected (consecutive) patients with SLE were tested for the presence of IgM aPT antibodies on the REAADS IgM aPT ELISA test kit. Using the cut-off of 20 M units, 12.2% of the samples reacted positive for IgM aPT antibodies (mean value = 11.8 M units, SD = 9.4). The mean IgM aPT value of this population was statistically different from the healthy blood donors ($p = 0.0044$).

Primary Antiphospholipid Syndrome (APS):

Serum samples from 11 patients with primary antiphospholipid syndrome (APS) were tested for the presence of IgM aPT antibodies on REAADS IgM aPT ELISA test kit. Using the cutoff of 20 M units, 27.3% of the samples reacted positive for IgM aPT antibodies (mean values = 15.7 M units, SD = 12.6). The mean IgM aPT value of this population was statistically different from the healthy blood donors ($p < 0.001$).

Serum Samples	Autoimmune	Unselected SLE	Primary APS
# of Samples (n)	40	41	11
Mean Value \pm SD (M units)	23.5 \pm 19.3	11.8 \pm 9.4	15.7 \pm 12.6
% Positive (Sensitivity)	45%	12.2%	27.3%

Lupus Anticoagulant (LA):

Sixty-one (61) citrated plasma (3.2% sodium citrate) samples with LA activity from three clinical institutions were tested for the presence of IgM aPT antibodies on REAADS IgM aPT ELISA test kit. The determination of LA activity was performed by each institution following published criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant.²⁴ Fifty-six (56) plasma samples with abnormal coagulation profiles but not meeting the diagnostic criteria for LA (controls) were also tested for the presence of IgM aPT antibodies. Using the cut-off of 20 M units, 24.6% of the samples of the LA positive tested positive for IgM aPT antibodies while only 5.4% of the controls tested positive. The mean IgM aPT value of the LA positive group was statistically different from the controls ($p = 0.001$). A summary of LA sensitivity testing is presented below.

Plasma Samples	Healthy	LA Controls	LA Positive
# of Samples (n)	100	56	61
Mean Value \pm SD (M units)	6.3 \pm 4.3	6.9 \pm 6.7	17.8 \pm 23.9
% Positive (Sensitivity)	3%	5.4%	24.6%

Comparison with antiphospholipid status (APL) of the sample

Healthy and disease state populations were tested for IgM isotypes of aPT, anticardiolipin (aCL), antiphosphatidylserine (aPS) and anti-Beta-2 Glycoprotein I ($\alpha\beta_2$ GPI) antibodies²⁵. Samples containing: 1) aCL and/or aPS and $\alpha\beta_2$ GPI antibodies; or 2) moderate to strong levels (> 50 Units) of $\alpha\beta_2$ GPI in the absence of aCL or aPS antibodies were classified as APL positive; all other samples were considered APL negative. The (%) agreement was calculated by comparing the positive and negative results obtained by each assay (aPT, aCL, aPS, and $\alpha\beta_2$ GPI) with the Antiphospholipid (APL) status of the sample. For example, 100% agreement would mean that individual test results (positive or negative) were consistent with the APL status (positive or negative) in all samples of a given population.

% agreement with APL status

	IgM aPT	IgM aCL	IgM aPS	IgM anti- β_2GPI
Healthy - Serum	97.5%	92.5%	97.5%	97.5%
Autoimmune	80%	62.5%	72.5%	97.5%
Unselected SLE	82.5%	90%	80%	92.5%
Primary APS	81.8%	90.9%	72.7%	100%
Healthy - Plasma	97%	100%	99%	99%
LA + (group 1)	60%	75%	75%	90%
LA controls	87.5%	94.6%	98.2%	96.4%

Precision

Samples with known IgM aPT antibody levels (one low, one moderate, and one high) were assayed in 23 replicates on three different plates from two different kit lots. The mean intra-assay and inter-assay coefficients of variation (%CVs) are presented in the following table. The reported intra-assay coefficient of variation is the mean of six separate %CVs. The reported inter-assay %CV is the coefficient of variation obtained from the mean %CV of three plates from two lots.

IgM aPT Value Range	Mean Intra-assay %CV	Mean Inter-assay %CV
Low (< 5 M units)	7.2%	3.8%
Moderate (15-20 M units)	4.4%	1.5%
High (42-49 M units)	4.1%	2.5%

LIMITATIONS OF THE TEST

Anti-prothrombin (aPT) antibodies are frequently found in the serum or plasma of Lupus Anticoagulant (LA) positive patients, however, not all aPT are associated with LA activity. The REAADS IgM anti-Prothrombin ELISA may detect aPT antibodies associated as well as those not associated with LA activity. The anti-prothrombin (aPT) antibody concentration values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. If clinical findings suggest the presence of antiphospholipid antibodies and the patient is negative for antiprothrombin antibodies, some investigators recommend testing for anti-cardiolipin antibodies, anti-phosphatidylserine antibodies, anti- β_2 glycoprotein I antibodies, and the lupus anticoagulant (LA) to confirm the negative result. A patient may be considered positive for antiphospholipid antibodies if one or all of the tests give positive results.

Warranty

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone +1-303-457-4345, fax +1-303-457-4519, email techsupport@Corgenix.com, or contact a Corgenix authorized distributor.

**REAADS®
IgM Anti-Prothrombin Semi-Quantitative Test Kit****In-vitro-Diagnostikum**

Ein enzymimmunologischer Assay (ELISA) zur semiquantitativen Bestimmung von IgM-Anti-Prothrombin (aPT)-Antikörpern in Humanserum oder Zitratplasma (3,2% Natriumzitrat).

ANWENDUNGSBEREICH

Nachweis und semiquantitative Bestimmung von IgM Anti-Prothrombin (aPT)-Antikörpern bei Personen mit Lupus erythematosus (SLE) oder lupusartigen Erkrankungen (z.B. Antiphospholipid-Syndrom).

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. Proben verdünnten Serums oder Zitratplasmas, Kalibratoren und Kontrollen werden in Mikrovertiefungen inkubiert, die mit gereinigtem Human-Prothrombin beschichtet sind. Die Inkubation ermöglicht eine Reaktion der in den Proben enthaltenen Anti-Prothrombin-Antikörper mit dem immobilisierten Antigen. Nach dem Auswaschen nicht gebundener Proteine werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, für Human-IgM spezifische Antikörper zugefügt, die mit den Prothrombin-gebundenen Antikörpern komplexieren. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid enthält, (H₂O₂) angefärbt. In den Vertiefungen entsteht eine Färbung, deren Intensität in direkter Beziehung zur Anti-Prothrombin-Antikörper-Konzentration steht. Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD oder Extinktion) in allen Vertiefungen mit einem Spektrophotometer. Vier Kalibrationsseren werden mitgeliefert, deren IgM-Anti-Prothrombin-Antikörper-Konzentration in M-einheiten angegeben ist. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Vierpunkt-Kalibrierungskurve verwenden. Für die Einpunktkalibration wird die Konzentration der Kalibratorseren durch die optische Dichte (OD) des Kalibrators dividiert und ein Umrechnungsfaktor erhalten. Die OD-Mittelwerte der anderen Proben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der IgM-Anti-Prothrombin-Antikörper in M-Einheiten zu erhalten. Zur Mehrpunktkalibrierung wird eine lineare Regressionsanalyse mit Kalibratorwerten gegen die Kalibrator-OD-Werte durchgeführt. Die Ergebnisse für Kontrollen und Patientenproben werden mit Hilfe der Kalibrierungskurve bestimmt.

REAGENZIEN

Bei 2-8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS IgM Anti-Prothrombin-Testkit (für insgesamt 96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien

(die Volumina sind je nach Kitgröße und –konfiguration unterschiedlich):

- 12 x 8 beschichtete Mikrovertiefungen (mit Rahmen) mit stabilisiertem Human-Prothrombin (12 x 8 Antigen Coated Microwells)
- 60 mL Probenverdünner II (blaugrüne Lösung) (Sample Diluent II)
- 3 Fläschchen (je 0,25 mL) IgM-Anti-Prothrombin-Kalibrator (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig) (human); die Antikörperkonzentration ist in M-Einheiten auf dem Fläschchenetikett angegeben.* Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden.
- 0,25 mL IgM-Anti-Prothrombin-Positivkontrolle (human); der erwartete M-Einheitenbereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. (IgM Positive Control)
- 0,25 mL Normale Kontrolle (human); der erwartete M-Einheitenbereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. (IgM Normal Control)
- 15 mL Antihuman-IgM-Ziegen-Antikörperlösung, HRP-konjugiert (rote Lösung) (IgM HRP-Conjugate Antibody)

- 15 mL Einkomponenten-Substratlösung; enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 0,01% Wasserstoffperoxid in saurem Puffer (Substrate (TMB/H₂O₂))
- 15 mL Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) (Stopping Solution (0.36N Sulfuric Acid))
- 2 Fläschchen (30 mL) Waschkonzentrat (33XPBS/Tween) (Wash Concentrate PBS/Tween 20)

***ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Materialien humanen Ursprungs, die zur Herstellung der in diesem Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen verwendet wurden, reagierten in den von der FDA geforderten Tests negativ auf HBsAg, HCV und HIV-I und II. Trotzdem sollten alle Humanblutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Bestimmte Bestandteile dieses Produkts enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Azidhaltige Lösungen müssen beim Ausgießen in den Abfluss mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in den Wasserrohren zu vermeiden.
6. Die Einkomponenten-Substratlösung kann Augen- und Hautreizungen verursachen. Beim Umgang damit Handschuhe, Augenschutz und Labormantel tragen. Danach gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
7. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46).

 Reizend. Biologisches Risiko .

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Als Probenmatrix sollte Serum oder Zitratplasma (3,2% Natriumzitrat) verwendet werden. Nach der Probenentnahme durch Venenpunktion sollte das Serum von den Zellen durch Zentrifugation getrennt werden, sobald das Blut geronnen ist.

Bei Verwendung von Zitratplasma sollte Blut durch Venenpunktion abgenommen und das Plasma durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 g sofort von den Vertiefungen getrennt werden. Der Überstand muss nach dem Zentrifugieren sorgfältig entfernt werden, um eine Kontamination mit Blutplättchen zu vermeiden. Wiederholtes Zentrifugieren und Separieren kann eine Blutplättchenkontamination minimieren. Lysierte oder alte Blutplättchen können die Ergebnisse verfälschen.

Wird die Probe nicht sofort analysiert, ist sie bei 2-8°C aufzubewahren. Wenn die Proben länger als 72 Stunden nicht analysiert werden, sind sie bei -20°C oder darunter aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Hämolyisiertes, ikterisches oder lipämisches Serum oder Plasma darf nicht verwendet werden, da dies die Ergebnisse verfälschen kann. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, sollten vor dem Test durch Zentrifugation geklärt werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

REAADS IgM Anti-Prothrombin-Testkit; eine vollständige Liste finden Sie unter „Reagenzien“.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der Waschlösung (2 l) und zum Nullabgleich des Platten-Lesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten zur Abgabe von Volumen zwischen 5 und 1000 µL mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumina
- Kolben oder Flaschen, 1 L
- Waschflaschen, vorzugsweise mit etwas zurückgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten, mit dem die Extinktion bei 450 nm bestimmt werden kann (650 nm als Referenzwellenlänge bei Verwendung eines Zweistrahphotometers)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können
- Mikrodilutionsröhrchen und ein Mikrodilutionsröhrchenständer mit 96 Vertiefungen für Probenverdünnungen und rasche Abgabe an Mikrotiterplatten

Hinweise zur Durchführung

1. Serum- bzw. Plasmaproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen - nicht aufschäumen. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren bzw. Testplasma dürfen erst kurz vor dem Assay verdünnt werden.
3. Für jeden Testlauf kann sich auf jeder Platte eine Vertiefung für Wasser befinden. In diese Vertiefung dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden dieser Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µL analysenreines Wasser hinzugefügt. Das Mikrotiterplatten- Lesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen Luft bzw. die mit Wasser gefüllte Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Waschlösung in der für die Wasser-Blindprobe reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn restliche Waschlösung nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen mit je 100 µL gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichförmigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Vertiefungen.
7. Exakte Zeitkontrolle bei allen Testschritten ist wichtig. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von Minuten zugefügt werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit dem Ende der Reagenzien- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der normalen Raumtemperatur (18-26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine mikrobielle Kontamination und eine Kreuzkontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
13. Die Reagenzien verschiedener Kit-Chargen nicht mischen oder miteinander verwenden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschlösung (PBS/Tween): 30 mL Waschkonzentrat abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 L verdünnen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete Waschlösung im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Der Test kann mit einer Einpunktkalibrierung (Kalibrator 2) oder mit einer Vierpunkt-Kalibrierung (Kalibrator 1, 2 und 3 plus Probenverdünner/Blindprobe als Kalibrator 4, gleich 0 M-Einheiten) durchgeführt werden. Bei Einpunktkalibrierung sollte ebenfalls eine Blindprobe mitgetestet werden. Es wird Probenverdünner ohne Serum und ohne Plasma in die Vertiefung gegeben. Diese Vertiefung wird im weiteren Testverlauf wie eine Kontrolle bzw. Patientenprobe behandelt.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und im bereitgestellten Säckchen aufbewahren.
3. Eine 1:51 Verdünnung von Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben im Probenverdünner (blaugüne Lösung) herstellen; z.B. 10 µL Probe auf 500 µL Probenverdünner entspricht einer Probenverdünnung von 1:51. Gut durchmischen.
4. 100 µL der verdünnten Kalibratoren (einschließlich Blindprobe/Kalibrator 4), Kontrollen und Patientenprobe(n) den jeweiligen Mikrozellen beifügen.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden. Die Halterung an den längeren Seiten zusammendrücken, um die Mikrovertiefungen während Inversion und Waschen zu sichern.
6. Viermal mit Waschlösung waschen. Alle Vertiefungen vollständig mit Waschlösung füllen. Die Mikrovertiefungen umdrehen, um die Flüssigkeit abzugießen. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Diesen Vorgang noch dreimal wiederholen. Die Vertiefungen auf saugfähigem Papier umdrehen und leicht abklopfen, um Reste der Waschlösung aufzusaugen.
7. 100 µL Antihuman-IgM-Antikörperlösung, HRP-konjugiert (rot) in die Vertiefungen geben.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
9. Wie in Schritt 6 beschrieben viermal mit Waschlösung waschen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
10. Jeder Vertiefung 100 µL Einkomponenten-Substratlösung zugeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µL Stopplösung (Schwefelsäure 0,36 N) pro Vertiefung beendet. Die Säure muss in der gleichen Reihenfolge und in gleicher Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während die bisher farblos gebliebene Lösung weiterhin farblos bleibt. Der Nullpunkt des Platten-Lesegeräts wird anhand der Wasser-Blindprobe oder gegen Luft eingestellt. Die optische Dichte (OD) aller Vertiefungen bei 450 nm ablesen (und bei 650 nm als Referenzwellenlänge bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers). Die OD-Werte sollten innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung abgelesen werden.

Ergebnisse

Einpunktkalibrierung

1. Den OD-Mittelwert berechnen, wenn Doppelbestimmungen von Kalibrator 2, Kontrollen und Patientenproben durchgeführt wurden.
2. Den Konzentrationswert des Kalibrators 2 (in M-Einheiten, aufgedruckt auf dem Fläschchenetikett) durch den zugehörigen OD-Wert bzw. OD-Mittelwert dividieren, um den Umrechnungsfaktor zu erhalten.

- Die OD-Werte bzw. OD-Mittelwerte der einzelnen Kontrollen und Patientenproben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der Anti-Prothrombin-(aPT) Antikörper in M-Einheiten zu erhalten.

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{IgM-aPT-Konzentration des Kalibrators 2 (in M-Einheiten)}}{\text{OD-Wert bzw. OD-Mittelwert des Kalibrators 2}}$$

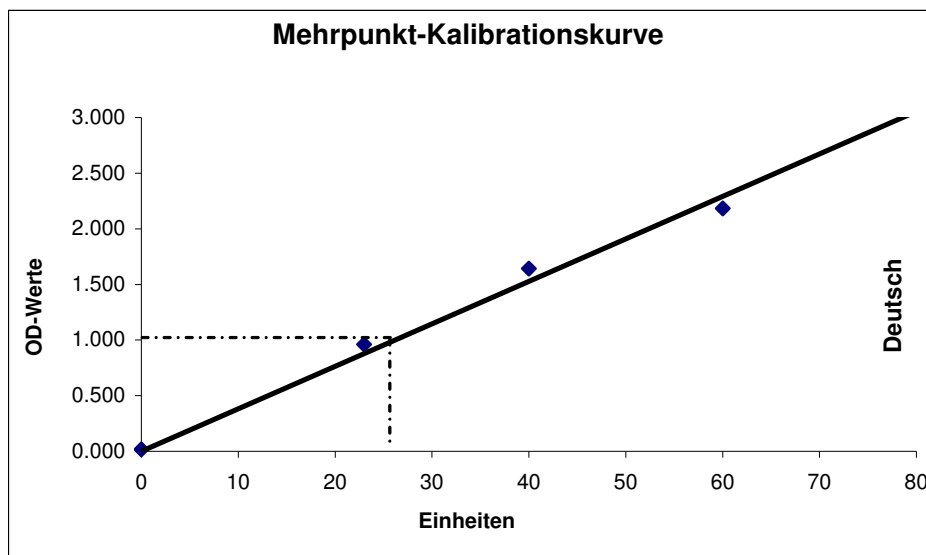
$$\text{IgM-aPT-Konzentration der Probe} = \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{OD-Wert bzw. OD-Mittelwert der Probe}$$

- Der Umrechnungsfaktor muss für jeden Testlauf berechnet werden. Die Verwendung eines Umrechnungsfaktors aus einem anderen Test macht die Ergebnisse ungültig.

Kalibration über Mehrpunktkurve

- Den OD-Mittelwert berechnen, wenn Doppelbestimmungen der Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben durchgeführt wurden.
- Eine lineare Regressionsanalyse mit den vier Kalibratorwerten (siehe M-Einheiten auf dem Fläschchenetikett; Kalibrator 4 [Probenverdünner] entspricht 0 M-Einheiten) gegen die ODs für alle Kalibratoren durchführen.
- Die Kalibratorkurve kann entweder automatisch mit Hilfe eines validierten Softwareprogramms oder manuell auf Millimeterpapier erstellt werden. Um negative Werte zu vermeiden sollte beim Erstellen der Regressionskurve ein Achsenabschnitt von Null verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollten etwaige negative Werte als Null angegeben werden. Bei manueller Erstellung der Kurve muss unter Verwendung eines Null-Achsenabschnitts eine Ausgleichsgerade durch die aufgetragenen Punkte gezogen werden.
- Mit Hilfe der Kalibrationskurve die Werte für Kontrollen und Patientenproben bestimmen.

Zum Beispiel:



In der als Beispiel verwendeten Kalibrationskurve entspräche eine OD der Probe von 0,860 bei 450 nm einem berechneten Wert von 26,2 Einheiten. Diese Kalibrationskurve dient nur Illustrationszwecken und darf nicht für die Berechnung von Patientenwerten verwendet werden. Zu jedem Testlauf sollte eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.

Qualitätskontrolle

1. Um die Zuverlässigkeit des Kits zu bestätigen, sollte der OD-Wert des Kalibrators 2 mindestens 0,600 betragen. OD-Werte von weniger als 0,600 für Kalibrator 2 können darauf hinweisen, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Der OD-Wert für Kalibrator 4 oder Blindprobe sollte unter 0,100 liegen, wenn das Spektrophotometer gegen die mit Wasser gefüllte Vertiefung auf Null gestellt wurde. Höhere Werte können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Platte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollproben erhaltenen Anti-Prothrombin-(aPT) Werte müssen mit dem auf dem Fläschchen angegebenen Sollbereich übereinstimmen. Gelegentliche geringe Abweichungen von diesem Bereich sind gestattet.
4. Die OD-Werte für etwaige zweite Vertiefungen der Kontrollen oder Patientenproben sollten innerhalb von +/- 20% des OD-Mittelwerts für diese Probe liegen, wenn die Extinktionswerte größer als 0,200 sind.
5. Jedes Labor sollte seine eigenen Grenzwerte für die jeweilige Patientenpopulation festlegen.
6. Proben mit Anti-Prothrombin-(aPT) Konzentrationen über 100 M-Einheiten können als „größer als 100 M-Einheiten“ angegeben.
7. Bevor die Analysenergebnisse berichtet werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt wurden.

NORMALBEREICH

Proben mit Serum und Zitratplasma (3,2% Natriumzitrat) von 100 gesunden Blutspendern wurden auf IgM-Anti-Prothrombin- (aPT) Antikörper getestet. Der folgende Normalbereich wurde festgelegt:

- Weniger als 20 M-Einheiten

GRENZEN DES TESTS

Anti-Prothrombin- (aPT) Antikörper werden oft im Serum oder Plasma von Lupus-Antikoagulans- (LA) positiven Patienten gefunden; nicht alle aPT werden jedoch der LA-Aktivität zugeschrieben. Der REAADS IgM-Anti-Prothrombin-ELISA kann sowohl aPT-Antikörper, die mit LA-Aktivität in Zusammenhang gebracht werden als auch Antikörper, die nicht mit LA-Aktivität in Zusammenhang gebracht werden, nachweisen. Die mit diesem Assay ermittelten Anti-Prothrombin (aPT)-Antikörperkonzentrationen sind lediglich als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Jeder Arzt muss dieses Ergebnis unter Einbeziehung des Krankheitsablaufes, der Patientendaten, des physischen Befundes und anderen diagnostischen Untersuchungen betrachten. Wenn klinische Befunde darauf hindeuten, dass Antiphospholipid-Antikörper vorhanden sind, der Patient jedoch negativ auf Anti-Prothrombin-Antikörper getestet, empfehlen manche Autoren den Test auf Anti-Kardiolipin-Antikörper, Anti-Phosphatidylserin- Antikörper, Anti- β_2 -Glykoprotein I-Antikörper und das Lupus-Antikoagulans (LA) zur Bestätigung des negativen Ergebnisses. Ein Patient kann als positiv für Anti-Phospholipid-Antikörper betrachtet werden, wenn ein oder alle Tests ein positives Resultat ergeben.

Garantie

Dieses Produkt wird mit der Garantie geliefert, dass es wie in dieser Packungsbeilage beschrieben funktioniert. Corgenix Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen bezüglich der Handelbarkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck und haftet in keinem Fall für Folgeschäden.

Unseren technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661. Nummern von außerhalb der USA: Telefon +1-303-457-4345, Fax +1-303-457-4519, E-Mail: techsupport@Corgenix.com. Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

REAADS®
IgM Anti-Prothrombin Semi-Quantitative Test Kit

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Dosage immunoenzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgM antiprothrombine (aPT) dans le sérum ou le plasma citraté (citrate de sodium 3,2 %) humain.

UTILISATION ENVISAGÉE

Pour la détection et la semi-quantification des anticorps IgM antiprothrombine (aPT) chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et de troubles de type lupique (syndrome des antiphospholipides).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Les micropuits enduits de prothrombine humaine purifiée sont incubés avec les échantillons, les étalons et les contrôles de plasma ou de plasma citraté dilués. L'incubation permet aux anticorps antiprothrombine présents dans les échantillons de réagir avec l'antigène immobilisé. Après élimination par lavage des protéines non liées, les anticorps spécifiques pour l'IgM humaine marqués à une peroxydase sont ajoutés, formant ainsi des complexes avec les anticorps antiprothrombine déjà fixés. Après un deuxième lavage, le conjugué est révélé par addition d'une unique solution contenant du tétraméthylbenzène (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à titre de substrat chromogène. L'intensité de la couleur développée dans les puits est proportionnelle à la concentration des anticorps antiprothrombine.

Le résultat s'obtient par lecture de la densité optique (D.O. ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Quatre sérums d'étalonnage sont fournis et la concentration d'anticorps antiprothrombine IgM est exprimée en unités M. L'utilisateur peut choisir d'utiliser un étalonnage à point unique ou une courbe d'étalonnage à quatre points. Dans le cas d'un étalonnage à point unique, le facteur de conversion s'obtient en divisant la valeur de la concentration de l'étalon par sa D.O. Les valeurs de D.O. des autres échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir les concentrations des anticorps IgM antiprothrombine en unités M. Dans le cas d'un étalonnage multipoint, effectuer l'analyse par régression linéaire des valeurs de l'étalon en fonction de la D.O. Les résultats des contrôles et des échantillons patient se déterminent à partir de la courbe d'étalonnage.

Réactifs

Stocker entre 2 et 8°C. Ne pas congeler.

Chaque kit d'IgM antiprothrombine REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants **(les volumes varient selon la taille et la configuration du kit) :**

- 12 x 8 micropuits enduits de prothrombine stabilisée (humaine), avec cadre (12 x 8 Antigen Coated Microwells)
- 60 mL de tampon pour échantillon II (solution bleu-vert) (Sample Diluent II)
- 3 flacons (de 0,25 mL) d'IgM antiprothrombine (humaine) étalon (1 élevé, 2 modéré, 3 bas) ; voir les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités M*. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique
- 0,25 mL d'IgM antiprothrombine humaine ; voir l'étiquette du flacon pour la plage en unités M prévue (IgM Positive Control)
- 0,25 mL de contrôle normal humain ; voir l'étiquette du flacon pour la plage en unités M prévue (IgM Normal Control)



- 15 mL de conjugué anticorps de chèvre anti-IgM humaine/PR (solution rouge) (IgM HRP-Conjugate Antibody)
- 15 mL de substrat à un composant ; contient 3,3',5,5'- tétraméthylbenzidine et 0,01% peroxyde d'hydrogène, dans un tampon acide (Substrate (TMB/H₂O₂))
- 15 mL de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) (Stopping Solution (0.36N Sulfuric Acid))
- 2 bouteilles (30 mL) de concentré de lavage (30X SPTP/Tween) (Wash Concentrate PBS/Tween 20)

*** ATTENTION : Contient de l'azide de sodium**

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

1. Les produits d'origine humaine utilisés pour préparer l'étalon et les contrôles inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAG, anti-HCV et anti-HIV-I & II selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons patient, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants de ce produit contiennent de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.
6. La solution substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Utiliser des gants, des protections oculaires et une blouse de laboratoire lors de la manipulation. Se laver soigneusement les mains après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources d'embrasement. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
7. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Irritant . Risque biologique .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Du sérum ou du plasma citraté (citrate de sodium à 3,2 %) doit être utilisé à titre de matrice d'échantillon. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le sérum immédiatement séparé des cellules par centrifugation après la formation du caillot.

Si du plasma citraté est utilisé, le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le plasma immédiatement séparé des cellules par centrifugation à 1 500 g durant 10 minutes. Pour cela, séparer soigneusement le plasma des cellules après la centrifugation, afin d'éviter la contamination par les plaquettes. Répéter l'opération si nécessaire. Des plaquettes lysées ou anciennes peuvent générer des résultats aberrants.

Si le test n'est pas effectué immédiatement, l'échantillon doit être conservé entre 2 et 8°C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20°C ou moins. Éviter la recongélation. De même, ne pas utiliser des plasmas ou des sérums hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni :

Kit de test d'IgM antiprothrombine REAADS ; voir « Réactifs », pour la liste complète.

Matériel requis mais non fourni :

- Eau pure pour analyse pour préparer la solution mère (2 L) et pour mettre à zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 µL et 1 000 µL, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacons ou bouteilles de 1 L
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semiautomatique
- Gants à usage unique
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire l'absorbance à 450 nm (référence à 650 nm si à double faisceau)
- Pipettes multicanal capables d'alimenter 8 puits simultanément.
- Tubes de microdilution et un support de tubes de microdilution pour 96 puits pour diluer les échantillons et les poser rapidement sur la plaque de micropuits.

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de sérum ou de plasma et les réactifs à température ambiante et bien mélanger avant utilisation, **éviter la formation de mousse**. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur.
2. Diluer les étalons, les contrôles et les tests de sérum ou de plasma extemporanément.
3. Un unique puits d'eau à blanc peut être inclus sur chaque plaque pour chaque lot de tests. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µL d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être programmé sur zéro ou à blanc sur l'air ou sur ce puits d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. La présence de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de plaque.
5. IMPORTANT: L'élimination imparfaite des résidus de solution mère risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de délivrer 100 µL dans 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Les échantillons, les étalons et les contrôles doivent être ajoutés en moins de minutes. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Toutes les étapes d'incubation commencent au moment de l'ajout de réactif ou d'échantillon.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26°C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination microbienne ou croisée des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
13. Ne pas mélanger ou utiliser ensemble des réactifs provenant de lots différents.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Solution mère (SPTP/Tween) : Mesurer 30 mL de concentré de lavage et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 L. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution mère inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.

Procédure de dosage

1. Le dosage peut être effectué avec un étalonnage à point unique (étalon 2) ou une courbe d'étalonnage à quatre points (étalon 1, 2 et 3 plus tampon pour échantillon/réactif à blanc à titre d'étalon 4 égal à 0 unité M). Un réactif à blanc de contrôle doit aussi être analysé avec la méthode d'étalonnage à point unique. Du tampon pour échantillon sans sérum ou plasma est ajouté au puits. Ce puits sera traité de la même manière qu'un contrôle ou un échantillon patient dans les étapes suivantes du dosage.
2. Retirer toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Diluer les échantillons, les étalons et les contrôles au 1/51e dans le tampon pour échantillon (solution bleu-vert). Exemple : 10 µL d'échantillon et 500 µL de tampon pour échantillon égale une dilution d'échantillon au 1/51e. Bien mélanger.
4. Ajouter 100 µL d'étalon (y compris le réactif à blanc/étalon 4), de contrôles et d'échantillon(s) patient dilués aux micropuits appropriés.
5. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits. Pour retenir les micropuits durant le retournement et le lavage, serrer le cadre par ses côtés longs.
6. Laver 4 fois à l'aide de solution mère. Remplir entièrement chaque puits de solution mère. Retourner les micropuits pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Répéter la procédure trois fois de plus. Retourner les puits sur du papier absorbant et tapoter afin d'absorber les résidus de solution mère. Ne pas laisser sécher les puits à aucun moment.
7. Ajouter 100 µL de conjugué anticorps anti-IgM humaine/PR (rouge) aux puits.
8. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter la solution conjuguée.
9. Laver 4 fois à l'aide de solution mère ainsi que décrit à l'étape 6. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
10. Ajouter 100 µL de solution substrat à un composant à chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Ajouter la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
11. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter l'acide aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution incolore reste incolore. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur l'air ou sur le puits d'eau à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm (et à la référence 650 nm si à double faisceau). La D.O. doit être mesurée dans les 5 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Résultats

Étalonnage à point unique

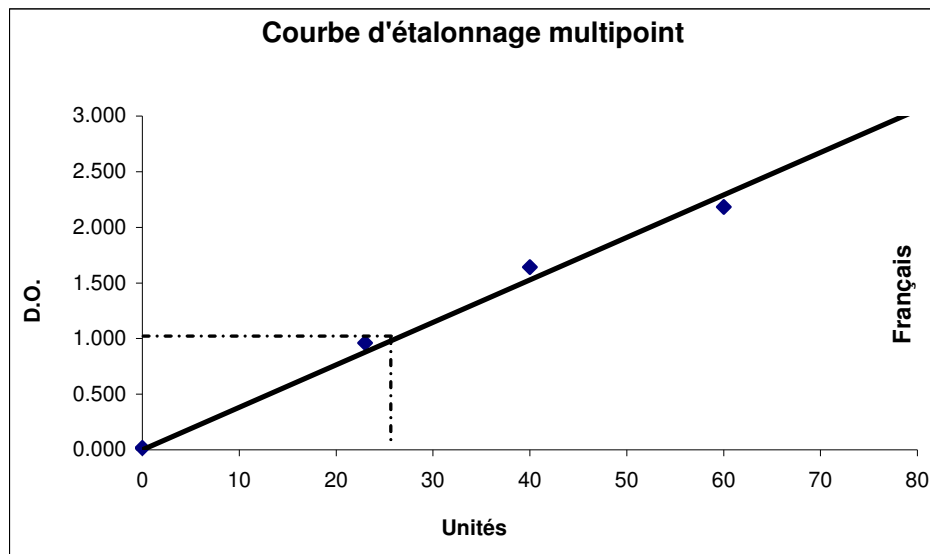
1. Calculer la D.O. moyenne si des doubles de l'étalon 2, des contrôles et des échantillons patient ont été traités.
2. Pour calculer le facteur de conversion, diviser la concentration de l'étalon 2 (imprimée sur l'étiquette du flacon) par la D.O. ou la D.O. moyenne obtenue pour cet étalon.
3. Multiplier la D.O. ou la D.O. moyenne de chacun des contrôles et des échantillons patient par le facteur de conversion pour obtenir la concentration d'anticorps antiprothrombine (aPT) en unités M.

Facteur de conversion	=	$\frac{\text{Concentration de l'étalon 2 en IgM aPT (en unités M)}}{\text{D.O. ou D.O. moyenne lue pour l'étalon 2}}$
Concentration en IgM aPT de l'échantillon	=	Facteur de conversion X D.O. ou D.O. moyenne de l'échantillon

4. Le facteur de conversion doit être calculé à chaque dosage. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage invaliderait les résultats.

Étalonnage par courbe multipoint

1. Calculer la D.O. moyenne si des doubles des étalons, des contrôles et des échantillons patient ont été traités.
2. Effectuer l'analyse par régression linéaire des valeurs des quatre étalons (se référer aux unités M des étiquettes des flacons ; l'étalon 4 [tampon d'échantillon] est égal à 0 unité M) comparées à la D.O. de chaque étalon.
3. La courbe d'étalonnage peut être tracée automatiquement à l'aide d'un logiciel validé ou manuellement sur du papier graphique. Il est recommandé de construire la ligne de régression en utilisant l'intercept zéro afin d'éviter les valeurs négatives. Si cette option n'est pas disponible, toute valeur négative doit être rapportée en tant que valeur nulle. Pour établir la courbe manuelle, tracer la ligne optimale passant par les points placés en utilisant l'intercept zéro.
4. Déterminer les valeurs des contrôles et des échantillons patient à partir de la courbe d'étalonnage.
Par exemple:



Selon la courbe d'étalonnage donnée en exemple, une D.O. d'échantillon de 0,860 à 450 nm correspondrait à une valeur calculée de 26,2 unités. La courbe d'étalonnage n'est donnée qu'à titre d'exemple et ne doit pas être utilisée pour calculer des résultats de patients. Effectuer une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque lot de tests.

Contrôle qualité

1. La D.O. de l'étalon 2 doit être d'au moins 0,600 pour s'assurer du bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,600 indique que le kit est arrivé à péremption.
2. La D.O. obtenue pour l'étalon 4, réactif à blanc, doit être inférieure à 0,100 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,100 peut indiquer que le réactif a été contaminé ou que la plaque a été mal lavée.
3. Les valeurs en antiprothrombine (aPT) obtenues pour les échantillons de contrôle doivent se situer dans la fourchette indiquée sur les étiquettes des flacons. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Si l'absorbance lue est supérieure à 0,200, la D.O. des puits en double des contrôles ou des échantillons patient obtenue doit être dans les 20% de la D.O. moyenne pour cet échantillon.
5. Chaque laboratoire doit confirmer ses valeurs seuil normales de la population de patients appropriée.
6. Les échantillons dont les valeurs d'antiprothrombine (aPT) sont supérieures à 100 unités M peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 100 unités M ».
7. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis avant de communiquer les résultats des tests.

PLAGE NORMALE

100 sérums et plasmas citratés (citrates de sodium 3,2%) provenant de donneurs de sang sains ont été testés pour les anticorps IgM antiprothrombine (aPT). Les plages normales suivantes ont été établies :

- Inférieure à 20 unités M

LIMITATIONS DU TEST

Des anticorps antiprothrombine (aPT) sont souvent détectés dans le sérum ou le plasma de patients positifs à l'anticoagulant lupus (LA) ; toutefois tous les aPT ne sont pas associés à une activité LA. Le dosage immunoenzymatique IgM antiprothrombine REAADS peut détecter les anticorps aPT, qu'ils soient associés ou non à une activité LA. Les valeurs obtenues d'anticorps antiprothrombine (aPT) constituent seulement une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Si le contexte clinique suggère la présence d'anticorps antiphospholipides et que le patient est négatif pour les anticorps antiprothrombine, certains chercheurs recommandent un dosage pour les anticorps anticardioline, antiphosphatidylsérine et anti- β_2 glycoprotéine I et pour l'anticoagulant lupus (LA) afin de confirmer le résultat négatif. On peut estimer qu'un patient est positif pour les anticorps antiphospholipides si un test ou tous les tests donnent un résultat positif.

Garantie

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans l'encart joint au conditionnement. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis: téléphone 1-800-729-5661. Au dehors des États-Unis: téléphone +1-303-457-4345 ; télécopie +1-303-457-4519 ; Email techsupport@Corgenix.com ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

REAADS®
IgM Anti-Prothrombin Semi-Quantitative Test Kit

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

Un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM antiprotrombina (aPT) en suero o plasma citratado (citrate de sodio al 3,2%) humanos.

INDICACIONES

Para la detección y semicuantificación de anticuerpos IgM antiprotrombina (aPT) en individuos con lupus eritematoso diseminado (LED) y enfermedades seudolúpicas (por ej., síndrome antifosfolípido).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero o plasma citratado, el calibrador y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de protrombina humana purificada. La incubación permite que los anticuerpos antiprotrombina presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Tras la eliminación, mediante lavado, de las proteínas no unidas, se añaden anticuerpos específicos para IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos a la protrombina. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo una solución de tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H₂O₂) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración de anticuerpos antiprotrombina.

Los resultados se obtienen leyendo la densidad óptica (D.O. o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministran cuatro sueros calibradores con las concentraciones de anticuerpos IgM antiprotrombina expresadas en unidades M. El usuario tiene la opción de usar un calibrador de un solo punto o una curva de calibración de cuatro puntos. En la calibración de un solo punto, para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero calibrador por el valor de la D.O. del calibrador. Los valores de la D.O. de las demás muestras se multiplican por el factor de conversión para obtener las concentraciones de anticuerpos IgM antiprotrombina en unidades M. Para la calibración multipuntual, realice un análisis de regresión lineal con los valores del calibrador respecto a las D.O. del calibrador. Los controles y los resultados de pacientes se determinan a partir de la curva de calibración.

REACTIVOS

Consérvelos entre 2 y 8°C. No los congele. Cada equipo de determinación de IgM antiprotrombina REAADS de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos

(los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo):

- 12 x 8 micropocillos recubiertos de protrombina humana estabilizada con marco. (12 x 8 Antigen Coated Microwells)
- 60 mL de diluyente de muestras II (solución verde azulada) (Sample Diluent II)
- 3 frascos con 0,25 mL de calibrador IgM antiprotrombina humana cada uno (1 alto, 2 moderado, 3 bajo); véase en la etiqueta del frasco la concentración de anticuerpo en unidades M.* Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto.
- 0,25 mL de antiprotrombina IgM humana de control positivo; el rango de unidad M esperado se especifica en la etiqueta del frasco. (IgM Positive Control)
- 0,25 mL de control normal humano; los rangos de unidad M esperados se especifican en la etiqueta del frasco. (IgM Normal Control)
- 15 mL de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP (solución roja). (IgM HRP-Conjugate Antibody)

- 15 mL de solución de sustrato de un componente que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y agua oxigenada al 0,01% en un tampón ácido. (Substrate (TMB/H₂O₂))
- 15 mL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N). (Stopping Solution (0.36N Sulfuric Acid))
- 2 envases de 30 mL de concentrado de lavado (tampón fosfato PBS 33x/Tween) (Wash Concentrate PBS/Tween 20)

*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

1. El material de origen humano empleado para preparar el calibrador y los controles incluidos con este equipo se ha examinado y resultó negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH I y II requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables cuando manipule reactivos del kit y lávese minuciosamente las manos después de su uso.
5. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.
6. La solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular y cutánea. Utilice guantes, protección ocular y bata de laboratorio cuando manipule esta solución. Lávese bien las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
7. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:
Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).

Irritante . Riesgo biológico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Como matriz de muestra debe emplearse suero o plasma citratado (citrate de sodio al 3,2%). La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos.

Si se utiliza plasma citratado, la sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células inmediatamente mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante debe extraerse cuidadosamente tras la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas. Se recomienda repetir los pasos de centrifugación y separación para minimizar la contaminación con plaquetas. Los trombocitos disueltos o deteriorados por el tiempo pueden producir resultados aberrantes.

Si no se analiza inmediatamente, la muestra debe almacenarse entre 2 y 8°C. Si fuera necesario conservar las muestras durante más de 72 horas, deben congelarse a una temperatura igual o inferior a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida. No utilice suero o plasma hemolizado, icterico o lipémico, ya que puede producir resultados erróneos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos

Prueba de IgM antiprotrombina REAADS; véase una lista completa en «Reactivos».

Materiales necesarios pero no suministrados:

- Agua para reactivos para preparar una solución de lavado (2 litro) y para ser usada como cero o testigo durante la lectura de la placa final del análisis.
- Cilindros graduados
- Pipetas de precisión capaces de administrar entre 5 y 1000 μL , con puntas apropiadas.
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Frascos o botellas de 1 L
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, con un sistema automático o semiautomático de lavado
- Guantes desechables
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble)
- Pipetas multicanal capaces de administrar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
- Tubos de microdilución y soporte de tubos de microdilución de 96 pocillos para diluciones de muestra y para la aplicación rápida a la placa de micropocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero o plasma y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones del calibrador, los controles y los sueros o el plasma deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo únicamente con agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 μL de agua para reactivos al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o borrarse con respecto a aire o a un pocillo de agua.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión apretando una botella de plástico de punta ancha dentro del fondo de los micropocillos. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automático de placas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de solución de lavado, la solución de sustrato puede desarrollar un color inconsistente.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de rellenar simultáneamente 8 pocillos con 100 μL en cada uno. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todos los calibradores, controles y muestras deben aplicarse en un plazo máximo de minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26°C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. No mezcle ni utilice componentes del equipo con diferentes números de lote del equipo.

Preparación del reactivo

Solución de lavado (PBS y Tween): Mida 30 mL de concentrado para lavado y dilúyalos en agua para reactivos hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución de lavado no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8°C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.

Procedimiento del ensayo

1. El ensayo puede realizarse con una calibración de un solo punto (calibrador 2) o una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3 más el diluyente de muestras o el reactivo testigo como calibrador 4 igual a 0 unidades M). También se debe realizar un control con reactivo testigo con el método de calibración de un punto. Se añade al pocillo diluyente de muestras sin suero ni plasma. Este pocillo se trata de la misma forma que las muestras de control o de pacientes en los siguientes pasos del ensayo.
2. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
3. Prepare una dilución 1:51 de los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes en el diluyente de muestras (solución verde azulada); por ejemplo, 10 μL de muestra añadidos a 500 μL de diluyente de muestras es igual a una dilución de muestra de 1:51. Mezcle bien.
4. Añada 100 μL de calibradores diluidos (incluidos el reactivo testigo y el calibrador 4), controles y muestras de pacientes a los micropocillos correspondientes.
5. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos. Para retener los micropocillos durante la inversión y el lavado, apriete el marco a lo largo de los lados de mayor longitud.
6. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado. Cada pocillo debe llenarse por completo con solución de lavado. Invierta los micropocillos y vacíe el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. Repita el proceso tres veces más. Invierta los pocillos sobre papel secante y deles unos golpecitos para retirar los restos de la solución de lavado. No permita que los pocillos se sequen en ningún momento.
7. Añada 100 μL de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM y HRP (roja) a los pocillos.
8. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche la solución conjugada.
9. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado, como se describe en el paso 6. No permita que los pocillos se sequen.
10. Añada 100 μL de solución de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada el sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
11. Añada 100 μL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir el ácido a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se añadió el sustrato. El sustrato azul se volverá amarillo y la solución incolora permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a aire o a un pocillo testigo de agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble). Los valores de la D.O. deben medirse en los 5 minutos posteriores al añadido de la solución de parada.

Resultados

Calibración de un solo punto

1. Calcule la lectura media de la D.O. si se hicieron duplicados del calibrador 2, los controles y las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del calibrador 2 (impreso en la etiqueta del frasco) por la lectura de su D.O. o su D.O. media.

- Para obtener un valor de concentración de anticuerpos antiprotrombina (aPT) expresado en unidades M, multiplique la lectura de la D.O. o de la media de la D.O. de cada uno de los controles y las muestras de los pacientes por el factor de conversión.

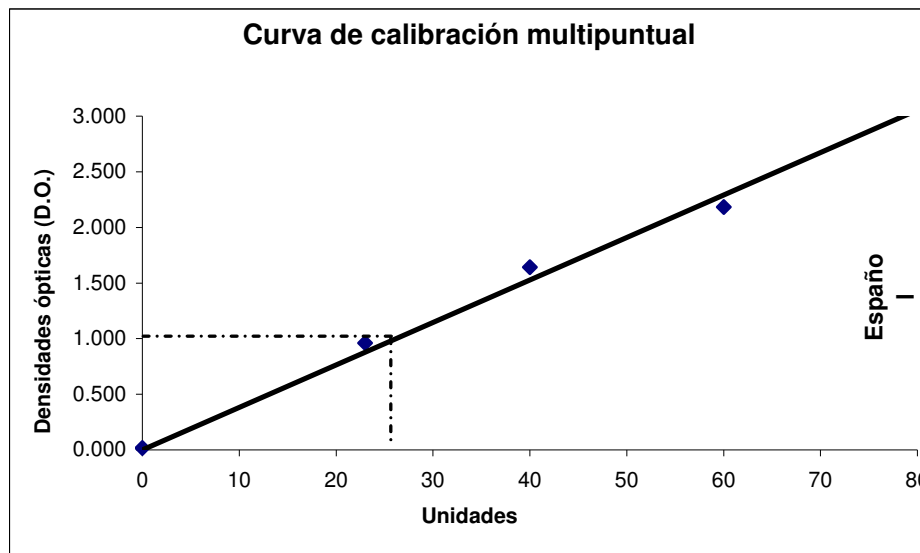
$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Concentración de aPT IgM del calibrador 2 (en unidades M)}}{\text{Lectura de la D.O. o de la D.O. media del calibrador 2}}$
$\text{Concentración de IgM aPT de la muestra} = \text{Factor de conversión} \times \text{D.O. o D.O. media de la muestra}$

- El factor de conversión debe calcularse en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo, los resultados obtenidos no serán válidos.

Curva de calibración multipuntual

- Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
- Realice un análisis de regresión lineal con los cuatro valores del calibrador (Véase en la etiqueta del frasco las unidades de M. El calibrador 4 [diluyente de muestras] es igual a 0 unidades M) respecto a las D.O. del calibrador.
- La curva del calibrador puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas. Para evitar los valores negativos, se recomienda utilizar una intersección en cero al generar la línea de regresión. Si no se dispone de esta opción, los valores negativos se indicarán como ceros. Al generar la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados utilizando una intersección de cero.
- Determine los valores de la muestra de controles y pacientes obtenidos a partir de la curva del calibrador.

Por ejemplo:



Usando la curva de calibración suministrada, la D.O. de una muestra de 0,860 a 450 nm correspondería a un valor calculado de 26,2 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo y no debe usarse para calcular los resultados del paciente. Debe realizarse una nueva curva de calibración con cada proceso de prueba.

Control de calidad

- La lectura de la D.O. del calibrador 2 debe ser como mínimo de 0,6 para garantizar que el equipo funcione adecuadamente. Las lecturas de D.O. del calibrador 2 inferiores a 0,600 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
- La D.O. del calibrador 4 o del reactivo testigo debe ser inferior a 0,100 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,100 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.

3. Los valores de antiprotrombina (aPT) obtenidos con las muestras de control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del frasco. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Las lecturas de la D.O. de pocillos duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar dentro del 20% de la lectura media de la D.O. de esa muestra si las lecturas de la absorbancia son superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores umbral para la población de pacientes correspondiente.
6. Las muestras con valores de antiprotrombina (aPT) de más de 100 unidades M pueden especificarse como «más de 100 unidades M».
7. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

RANGO NORMAL

Se comprobaron los anticuerpos IgM antiprotrombina (aPT) de las muestras de suero y plasma citratado (citrato de sodio al 3,2%) de 100 donantes de sangre sanos. Se estableció el siguiente rango normal:

- Menos de 20 unidades M

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los anticuerpos antiprotrombina (aPT) se encuentran frecuentemente en el suero o el plasma de pacientes que dan positivo en las pruebas de anticoagulante lúpico (AL); no obstante, no todos los aPT se asocian con la actividad del AL. El ELISA de la IgM antiprotrombina REAADS puede detectar anticuerpos aPT asociados y no asociados a la actividad del AL. Las concentraciones de anticuerpos antiprotrombina (aPT) obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Si los hallazgos clínicos indican la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y el paciente resulta negativo para los anticuerpos antiprotrombina, algunos investigadores recomiendan analizar la presencia de anticuerpos anticardiolipina, anticuerpos antifosfatidilserina, anticuerpos anti- β_2 glucoproteína I y anticoagulante lúpico (AL) para confirmar el resultado negativo. Un paciente puede considerarse positivo para los anticuerpos antifosfolipídicos si se obtienen resultados positivos en una o en todas las pruebas.

Garantía

Se garantiza que este producto funcionará según se describe en este prospecto. Corgenix, Inc. desautoriza cualquier garantía implícita de comerciabilidad o aptitud para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. se hará responsable de daños emergentes.

Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al 1-800-729-5661. Fuera de los EE.UU. llame al +1-303-457-4345, envíe un fax al +1-303-457-4519, envíe un correo electrónico a techsupport@Corgenix.com o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

REAADS® IgM Anti-ProthrombinSemi-Quantitative Test Kit

Per uso diagnostico *in vitro*

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgM anti-protrombina (aPT) nel siero umano o nel plasma citrato (3,2% di citrato di sodio).

USO PREVISTO

L'individuazione e la determinazione semiquantitativa di anticorpi IgM anti-protrombina (aPT) nei soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) e da disturbi di tipo lupus (ad es., sindrome da antifosfolipidi).

PRINCIPIO DEL TEST

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. I campioni di siero o di plasma citrato diluiti, il calibratore e i controlli vengono incubati in micropozzetti rivestiti di protrombina umana purificata. L'incubazione permette agli anticorpi anti-protrombina presenti nei campioni di reagire con l'antigene immobilizzato. Dopo l'allontanamento per lavaggio delle proteine libere, vengono aggiunti anticorpi specifici per IgM umana marcati con perossidasi di rafano (HRP) in modo da formare complessi con gli anticorpi legati alla protrombina. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene dosato mediante aggiunta di una singola soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2) come substrato cromogeno. Il colore si sviluppa nei pozzetti ad una intensità proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-protrombina nel siero.

I risultati si ottengono leggendo in uno spettrofotometro la densità ottica (D.O. o assorbanza) di ciascun pozzetto. I quattro sieri di calibrazione vengono forniti con la concentrazione di anticorpi IgM anti-protrombina espressa in unità M. L'utente può usare un calibratore a punto singolo o una curva di calibrazione a quattro punti. Quando si esegue la calibrazione a punto singolo, per ricavare un fattore di conversione basta dividere il valore di concentrazione dei sieri di calibrazione per il valore di densità ottica del calibratore. I valori di densità ottica degli altri campioni moltiplicati per un fattore di conversione permettono di ottenere le concentrazioni di anticorpi IgM anti-protrombina espresse in unità M. Per la calibrazione a più punti, eseguire l'analisi della regressione lineare con i valori dei calibratori in funzione dei valori della densità ottica dei calibratori. I controlli e i risultati del campione del paziente sono determinati dalla curva di calibrazione.

Reagenti

Conservare a 2-8°C. Non congelare.

Ciascun kit REAADS a 96 pozzetti per il dosaggio di IgM antiprotrombina contiene i seguenti reagenti **(i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit).**

- 12x8 micropozzetti rivestiti di protrombina (umana) stabilizzata, con griglia (12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 mL di diluente per campioni II (soluzione blu-verde). (Sample Diluent II)
- 3 flaconi (0,25 mL ciascuno) di calibratore anti-protrombina IgM (1-elevato, 2-moderato, 3-basso) (umana); vedere l'etichetta dei flaconi per la concentrazione di anticorpi in unità M.* Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo.
- 0,25 mL di controllo positivo anti-protrombina IgM (umana), vedere l'etichetta del flacone per il range previsto in unità M* (IgM Positive Control)
- 0,25 mL di controllo normale umano, vedere l'etichetta del flacone per il range previsto in unità M* (IgM Normal Control)

- 15 mL di soluzione (rossa) di anticorpo IgM di capra antiumano coniugato con HRP. (IgM HRP-Conjugate Antibody)
- 15 mL di soluzione di substrato monocomponente; contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 0,01% di perossido di idrogeno in tampone acidico (Substrate (TMB/H₂O₂))
- 15 mL di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico). (Stopping Solution (0.36N Sulfuric Acid))
- 2 flaconi (30 mL) di concentrato di lavaggio (33X PBS/Tween) (Wash Concentrate PBS/Tween 20)

***ATTENZIONE: contiene azoturo di sodio**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*

1. Il materiale di origine umana usato per la preparazione del calibratore e dei controlli inclusi in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti dell'FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si manipolano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante. È stato riportato che la sodio azide, a contatto con rame o piombo, può formare azidi metalliche. Tali azidi metalliche sono esplosive. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere eliminate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
6. La soluzione di substrato monocomponente può causare irritazione agli occhi e alla cute. Quando si maneggia il substrato occorre indossare guanti, protezione per gli occhi e camice da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver manipolato il substrato. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
7. Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46)

Irritante . Rischio biologico .

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Come matrice dei campioni, usare siero o plasma citrate (3,2% di citrato di sodio). Il sangue va prelevato per venipuntura e il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo coagulazione.

Quando si usa il plasma citrato, prelevare il sangue per venipuntura e separare immediatamente il plasma dalla parte corpuscolata del sangue mediante centrifugazione a 1500 g per 10 minuti. Per evitare la contaminazione con le piastrine, rimuovere con attenzione il tensioattivo dopo centrifugazione. Si consiglia di ripetere più di una volta i procedimenti di centrifugazione e separazione al fine di minimizzare la contaminazione da piastrine. Le piastrine lisate o invecchiate possono dar luogo ad artefatti.

Un campione che non viene analizzato immediatamente deve essere conservato a 2 - 8°C. Se devono essere conservati per più di 72 ore, i campioni vanno congelati a -20°C o a temperatura inferiore. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non usare siero o plasma emolizzati, itterici o lipemici, poiché queste condizioni possono produrre risultati errati. I campioni contenenti particelle visibili devono essere centrifugati prima del test.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit per dosaggio di IgM anti-protrombina REAADS; per un elenco completo, vedere "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata per la preparazione della soluzione di lavaggio (2 litro) e la taratura o azzeramento del lettore di piastre nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di dosare da 5 a 1000 μL , con punte appropriate.
- Vetreria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beute o flaconi da 1 L
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con punta parzialmente tagliata per allargare il getto, o con un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per lettura di piastre in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (650 nm standard per fascio doppio).
- Pipette multicanale per il dosaggio simultaneo in 8 pozzetti
- Provette per microdiluizione e portaprovette per microdiluizione in 96 pozzetti per la diluizione dei campioni e la dispensazione rapida alla piastra di pozzetti.

Note procedurali

1. Portare a temperatura ambiente i campioni di siero o di plasma e i reagenti e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni ed i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e del siero o plasma per il test vanno eseguite solo immediatamente prima del dosaggio.
3. È possibile includere un pozzetto bianco in ogni piastra per ciascuna analisi. A questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungervi invece 200 μL di acqua distillata immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Il lettore della piastra va programmato a "zero" o "bianco" tarandolo con aria o un pozzetto con acqua.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante ai fini del rendimento ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato dirigere nel fondo dei pozzetti un getto forte di soluzione di lavaggio erogata da un flacone di plastica morbida con punta larga. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. Si può usare anche un sistema di lavaggio automatico della piastra.
5. **IMPORTANTE:** se non si rimuovono adeguatamente eventuali residui di soluzione di lavaggio, la soluzione di substrato potrebbe sviluppare un colore non uniforme.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale che possa dosare simultaneamente 100 μL in ciascuno degli 8 pozzetti. Ciò aumenta la rapidità dell'analisi e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. Tutti calibratori, i controlli e i campioni vanno aggiunti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve superare la quantità che può essere aggiunta entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia al termine dell'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
10. Le temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26°C) possono contribuire a dar luogo a risultati errati.
11. Quando si aprono i flaconi originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione crociata e batterica dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
13. Non miscelare o utilizzare componenti di kit da differenti lotti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio (PBS/Tween): Misurare 30 mL di concentrato di lavaggio e diluirlo a 1 L con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione di lavaggio inutilizzata in frigorifero a $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione crociata o batterica.

Procedura di analisi

1. Il dosaggio può essere eseguito con una calibrazione a punto singolo (calibratore 2) o con una curva di calibrazione a quattro punti (calibratori 1, 2 e 3, più diluente per campioni/bianco reagente come calibratore 4, pari a 0 unità M). Analizzare anche un bianco reagente di controllo con il metodo di calibrazione a punto singolo. Dispensare nel pozzetto il diluente per campioni senza siero o plasma. In tutte le fasi successive del dosaggio, questo pozzetto sarà trattato come un controllo o un campione prelevato dal paziente.
2. Staccare tutte le strisce di pozzetti non utilizzate e riporle nella busta in dotazione.
3. Preparare una diluizione 1:51 dei calibratori, dei controlli e dei campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione (soluzione blu-verde); ad esempio: 10 μL di campione aggiunto a 500 μL di diluente per campione equivale ad una diluizione del campione pari a 1:51. Miscelare accuratamente.
4. Aggiungere ai pozzetti appropriati 100 μL di calibratori, (incluso il bianco reagente/calibratore 4), controlli e campioni diluiti.
5. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di campione. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i campioni. Per trattenere i micropozzetti durante l'inversione e il lavaggio, premere sui lati più lunghi della griglia.
6. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio. Riempire completamente con soluzione di lavaggio ciascun pozzetto. Capovolgere i micropozzetti per svuotare il liquido. Con un movimento deciso del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Ripetere il procedimento altre tre volte. Capovolgere i pozzetti su carta assorbente e battere leggermente per asciugare i residui di soluzione di lavaggio. Non lasciare mai asciugare completamente i pozzetti.
7. Aggiungere ai pozzetti 100 μL di soluzione (rossa) di anticorpi anti-IgM umani coniugati con HRP.
8. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato.
9. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio come indicato nel passaggio 6. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
10. Aggiungere 100 μL di soluzione di substrato monocomponente in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
11. Aggiungere 100 μL di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) in ciascun pozzetto per fermare la reazione enzimatica. Assicurarsi di aggiungere l'acido ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui è stato aggiunto il substrato. La soluzione di substrato blu diventa gialla, mentre la soluzione incolore rimane invariata. Tarare o azzerare il lettore di piastre confrontandolo all'aria o ad un pozzetto del bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm (con riferimento a 650 nm nel caso di fascio doppio). I valori di densità ottica devono essere misurati entro 5 minuti dall'aggiunta di soluzione di arresto.

Risultati

Calibrazione a punto singolo

1. Calcolare il valore medio di densità ottica se sono stati eseguiti duplicati del calibratore 2, dei controlli, e dei campioni prelevati dai pazienti.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione del calibratore 2 (stampato sull'etichetta del flacone) per il suo valore di densità ottica o per il valore medio di densità ottica.

- Per ottenere un valore di concentrazione di anticorpi antiprotrombina (aPT) espresso in unità M, moltiplicare il valore di densità ottica o il valore medio di densità ottica di ciascun controllo e di ciascun campione prelevato da paziente per il fattore di conversione.

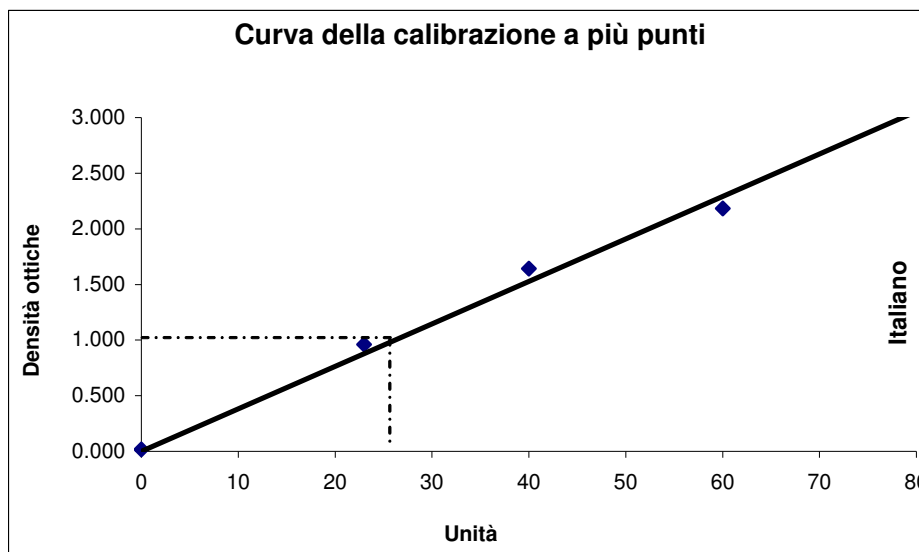
Fattore di conversion	=	$\frac{\text{Concentrazione di IgM aPT nel calibratore 2 (in unità M)}}{\text{Valore di densità ottica o di densità ottica media del calibratore 2}}$
Concentrazione di IgM aPT nel campione	=	Fattore di conversione X Densità ottica o densità ottica media del campione

- Il fattore di conversione deve essere calcolato per ciascun test. Se si usa un fattore di conversione da un altro dosaggio, i risultati non saranno validi.

Calibrazione con curva a più punti

- Calcolare il valore medio di densità ottica se sono stati eseguiti duplicati dei calibratori, dei controlli, e dei campioni dei pazienti.
- Eeguire l'analisi di regressione lineare con i quattro valori di calibrazione (per le unità M, vedere le etichette dei flaconi; il calibratore 4 [diluente per campioni] è uguale a 0 unità M) rispetto alla densità ottica di ciascun calibratore.
- La curva del calibratore può essere tracciata automaticamente usando un software convalidato o manualmente su carta millimetrata. Per evitare di ottenere valori negativi, si raccomanda di usare un'intercetta zero quando si genera la linea di regressione. Se questa opzione non è disponibile, gli eventuali valori negativi vanno riportati come unità zero. Per la generazione manuale della curva, congiungere con la linea più idonea i punti tracciati utilizzando un'intercetta zero.
- Determinare i valori del siero di controllo e del campione dalla curva del calibratore.

Esempio:



Quando si utilizza la curva di calibrazione fornita come esempio, la densità ottica di un campione pari a 0,860 a 450 nm corrisponderà ad un valore calcolato di 26,2 unità. La curva di calibrazione è fornita esclusivamente a scopo esemplificativo e non va usata per calcolare i risultati dei pazienti. Una nuova curva di calibrazione va ottenuta con l'esecuzione di ciascuna analisi.

Controllo di qualità

- Per garantire il corretto funzionamento del kit, il valore di densità ottica del calibratore 2 deve essere almeno = 0,600. Valori di densità ottica del calibratore 2 inferiori a 0,600 possono indicare che il kit non è più valido.
- Dopo la taratura dello spettrofotometro sul pozzetto bianco, la densità ottica del calibratore 4 o del bianco reagente deve essere inferiore a 0,100. Valori più alti di 0,100 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente o un insufficiente lavaggio della piastra.

3. I valori di anti-protrombina ottenuti per i campioni di controllo devono essere compresi negli range indicati sulle etichette dei flaconi. Piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range sono accettabili.
4. I valori di densità ottica dei pozzetti duplicati dei controlli o dei campioni prelevati dai pazienti devono rimanere entro il 20% della densità ottica media di quel campione, se l'assorbanza risulta superiore a 0,200.
5. Ogni laboratorio deve determinare i propri valori di cut-off per una determinata popolazione di pazienti.
6. I campioni con valori di anti-protrombina (aPT) superiori a 100 unità M possono essere riportati come "superiori a 100 unità M".
7. Assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità prima di riportare i risultati del test.

VALORI DI RIFERIMENTO

Per gli anticorpi IgM anti-protrombina (aPT), sono stati analizzati campioni di siero e di plasma citrato (3,2% di citrate di sodio) da 100 donatori di sangue sani. Sono stati stabiliti i seguenti range normali:

- Meno di 20 unità M

LIMITI DEL TEST

Gli anticorpi anti-protrombina (aPT) sono spesso reperibili nel siero o nel plasma di pazienti positivi per l'anticoagulante tipo lupus (LA); tuttavia non tutti gli anticorpi aPT sono associate all'attività dell'anticoagulante tipo lupus. Le metodiche ELISA IgM anti-protrombina REAADS sono in grado di individuare sia gli anticorpi aPT associati che quelli non associati all'attività dell'anticoagulante tipo lupus. Le concentrazioni di anticorpi anti-protrombina (aPT) ottenute con questo dosaggio sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altri procedimenti diagnostici. Se i risultati clinici fanno pensare alla presenza di anticorpi anti-fosfolipidi mentre il paziente è negativo per gli anticorpi anti-protrombina, alcuni ricercatori suggeriscono, per confermare il risultato negativo, di esaminare l'eventuale presenza di anticorpi anti-cardiolipina, anticorpi antifosfatidilserina, anticorpi anti- β_2 -glicoproteina I e di anticoagulante tipo lupus (LA). Un paziente può essere considerato positivo per gli anticorpi antifosfolipidi se uno o tutti i test sono positivi.

Garanzia











Si garantisce l'efficacia di questo prodotto secondo la descrizione fornita nel foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali Danni indiretti.

Per ottenere assistenza tecnica o per rivolgersi al servizio clienti, negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Fuori dagli Stati Uniti, chiamare il numero +1-303-457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519, inviare un messaggio di posta elettronica all'indirizzo techsupport@Corgenix.com o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Anti-phospholipid Antibodies. *Clin Rheum Dis.* 11:591, 1985.
2. Galli M, Comfurius P, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 335:1544, 1990.
3. McNeil HP, Simpson RJ, et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: B₂- glycoprotein I. *Proc Nat Acad Sci USA* 87:4120, 1990.
4. Bevers EM, Galli. M, Barbui T, et al. Lupus anticoagulant IgM's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 66:629, 1991
5. Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" antibodies. *Blood* 84:2854, 1994.
6. Permpikul P, Rao LVM, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and B₂ glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 83:2878, 1994.
7. Hunt JE, Krilis SA. The fifth domain of B₂-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol.* 152:653, 1994.
8. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, et al. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol.* 148:3885, 1992.
9. Guerin J, Feighery C, et al. Antibodies to B₂-glycoprotein I--a specific marker for the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol.* 109:304, 1997.
10. Dier K, Keedy K, Fink C, Lopez L. Correlation of IgM, IgM and IgA anti-B₂ glycoprotein I antibodies with thrombosis in SLE patients. *Lupus* 7:S185, 1998.
11. Gomez-Pacheco L, Villa AR, et al. Serum anti-B₂-glycoprotein-I and anticardiolipin antibodies during thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. *Am J Med.* 106:417, 1999.
12. Arvieux J, Darnige, L, et al. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 74:1120, 1995.
13. Asherson RA, Khamashta MA, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine* 68:366, 1989.
14. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 42:1309, 1999.
15. Horbach DA, Oort EV, et al. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 76:916, 1996.
16. Galli M, Barbui T, et al. Prothrombin as cofactor for antiphospholipids. *Lupus* 7:suppl 2, S37, 1998.
17. Horbach DA, van Ort E, et al. The contribution of antiprothrombin-antibodies to lupus anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 79:790, 1998.
18. Galli M, Barbui T, et al. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 93:2149, 1999.
19. Galli M, Ruggeri L, Barbui T. Differential effects of anti-B₂-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies on the anticoagulant activity of activated Protein C. *Blood* 91:1999, 1998.
20. Galli M, Finazzi G, Norbis F, et al. The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulants is predicted by their specific coagulation profile. *Thromb Haemost.* 81:695, 1999.
21. de Groot PG, Horbach DA, et al. Anti-prothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulant. *Lupus* 7:suppl 2, S32, 1998.
22. Guerin J, Smith O, White B, et al. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 102:896, 1998.
23. Vaarala O, Puurunen M, et al. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle aged men. *Thromb Haemost* 75:456, 1996.
24. Brandt JT, Triplett DA, et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 74:1185, 1995.
25. Data on File

SYMBOL LEGEND

										
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Irritant	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtiger	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Reizend	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Irritant	Risque biologique	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Irritante	Riesgo biológico	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Irritante	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstrasse 80
 D-66386 St. Ingbert/Germany



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA

REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
 © 2008, Corgenix, Inc.

10294 08
 Effective: 2008-01-11