

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA

For *In Vitro* Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of IgG anti-polymer antibodies in human serum.

INTENDED USE

The patented APA Test Kit is a semi-quantitative ELISA which detects IgG anti-polymer antibodies (APA) and identifies certain fibromyalgia patients. The APA Test Kit is intended for use: 1) as an aid in the diagnosis of patients presenting with the symptoms and signs of fibromyalgia syndrome, 2) as an aid in differentiating fibromyalgia patients from patients with other autoimmune diseases, and 3) as an aid in identifying a subgroup of fibromyalgia patients having a unique characteristic immune response.

SUMMARY AND EXPLANATION

Fibromyalgia Syndrome (FMS) is a chronic disorder characterized by subjective musculoskeletal pain and semi-objective tenderness to deep palpitation at defined somatic tender points. The American College of Rheumatology (ACR) criteria for the classification of FMS have provided a highly sensitive and specific means of identifying affected individuals. Based on those criteria, estimates for the prevalence of FMS in the general population ranges from 2 to 10% with females being affected 7 – 9 times more commonly than males.

A number of systemic manifestations occurring as co-morbidity in some FMS patients, but not required by the ACR criteria, include chronic widespread pain, insomnia, fatigue, morning stiffness, weakness, irritable bowel, interstitial cystitis, and reactive depression. One important benefit derived from establishing reliable criteria for the diagnosis of FMS has been the relatively homogeneous group of patients that can be assembled for a systematic evaluation of proposed laboratory abnormalities.

A variety of clinical similarities between Silicone Breast Implant (SBI) recipients and Fibromyalgia patients led to investigations of the APA levels in Fibromyalgia patients. Wilson, et al found that the APA positive rate in patients with FMS (47%) was higher than that in patients with osteoarthritis [OA] (19%) or rheumatoid arthritis [RA] (8%). The same was true for comparisons with lupus erythematosus [SLE] (3%), and progressive systemic sclerosis [PSS] (3%). The prevalence of APA seroreactivity was also significantly higher in patients with severe FMS (61%) than in FMS patients with less severe symptoms. These results suggest that the APA assay might be an objective marker for both the diagnosis and the clinical prognosis of Fibromyalgia.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum samples, calibrator, and controls are incubated in polymer coated microwells. Incubation allows the anti-polymer antibodies present in the samples to react with the immobilized coated surface. After the removal of unbound proteins by washing, antibodies specific for human IgG labeled with horseradish peroxidase (HRP) are added forming complexes with the polymer 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-polymer antibodies.

Results are obtained by reading the optical density (OD or absorbance) of each well on a spectrophotometer. A calibrator serum is provided with the IgG anti-polymer antibody concentration expressed in Units. Dividing the concentration value of the calibrator sera by the OD of the calibrator provides a conversion factor. The OD reading of the other samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgG anti-polymer antibody concentration in Units.

REAGENTS

Store at 2 – 8°C . Do Not Freeze.

Each APA 96-microwell ELISA Kit contains the following reagents

- 96 APA Antigen Coated Microwells (12 strips of 8 wells), with frame
- 2 bottles (60 mL) APA Sample Diluent (green solution)
- 1 vial (0.250 mL) APA Calibrator (human source) *
- 1 vial (0.250 mL) APA Positive Control (human source) *
- 1 vial (0.250 mL) APA Normal Control (human source)*
- 1 bottle (15 mL) APA HRP-Conjugated Antibody Solution (goat anti-Human IgG)
- 1 bottle (15 mL) One Component Substrate (TMB/H₂O₂); ready to use
- 1 bottle (15 mL) Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid)
- 2 bottles (30 mL) Wash Concentrate (33X PBS/Tween 20)

*** 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, Syphilis, 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. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
7. Certain components are labeled with the following: Harmful if swallowed (R 22). Irritating to eyes and skin (R 36/38). Avoid contact with skin and eyes (S 24/25). In case of contact with eyes, flush affected areas with copious amounts of water and seek medical advice (S 26). Wear suitable protective clothing (S 36).

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum is the preferred sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the serum separated from the cells by centrifugation after clot formation. If not tested immediately, specimens should be stored at 2-8°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 as these conditions may cause aberrant results. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA; see "Reagents" for a complete list.

Materials Required but not Supplied:

- Reagent grade water to prepare PBS/Tween 20 wash solution (1L)
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 10 and 1000 μL , with appropriate tips
- Miscellaneous glassware or dilution tubes appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system
- Disposable gloves
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (with a 650 nm reference, if available)
- Multichannel pipettors capable of delivering 100 μL to eight wells simultaneously
- Reagent reservoirs to facilitate delivery of reagents by multichannel pipettors

Procedural Notes

1. Bring serum samples and kit reagents to ambient temperature (18-26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage as soon as possible.
2. All dilutions of calibrator, control, and test sera must be made just prior to use in the assay.
3. An Air Blank (zero instrument on air prior to final reading of wells) or a Water Blank (optional) must be used on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to the Water Blank well. For a Water Blank, 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 the 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 microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS/Tween 20 can cause inconsistent color development of the Substrate Solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to eight 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 to the plate within a five-minute period. Batch size of samples should not be larger than the number 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 the ambient temperature of 18-26°C may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials. Pour or pipette only the volume of reagents needed. Do not return excess volumes of either HRP-Conjugated Antibody Solution or One Component Substrate Solution to the original bottles.
12. Do not use kit components beyond expiration date.
13. Do not use kit components from different kit lot numbers.

REAGENT PREPARATION

Wash Solution (PBS/Tween 20): Measure 30 mL of Wash Concentrate (33X PBS/Tween 20) and dilute to 1 liter 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 other contamination.

Assay Procedure

1. Assay the calibrator and controls in duplicate. It is advised that duplicate determinations also be made for each patient sample. At least one well should be run as a reagent control; APA Sample Diluent without serum or plasma is added to a well. This well will be treated the same as sample wells 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 1:101 dilution of the calibrator, controls, and patient samples in APA Sample Diluent (green solution), e.g., 10 μ L sample plus 1000 μ L APA Sample Diluent equals a 1:101 sample dilution.
4. Add 100 μ L of diluted calibrator, controls, and patient samples to the appropriate microwells.
5. Add 100 μ L of APA Sample Diluent to the reagent control well.
6. Incubate 60 minutes at 18-26°C. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump or aspirate the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
7. Wash 4 times with PBS/Tween 20 wash solution. Grasp the plate frame and squeeze at the top and bottom to retain microwells during washing. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. Completely fill each well with wash solution, then remove or shake out the wash solution into a container or sink 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.
8. Add 100 μ L HRP-Conjugated Antibody Solution (blue solution) to all wells. Incubate for 30 minutes at 18-26°C. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and dump or aspirate the conjugate solution.
9. Wash 4 times with PBS/Tween 20 wash solution as in step 7.
10. Add 100 μ L One Component Substrate Solution to each well and incubate for 30 minutes at 18-26°C. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
11. Add 100 μ L Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add the Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the substrate was added. Blue substrate color reactions will turn yellow and colorless solution will remain colorless when Stopping Solution is added.
12. If a Water Blank is used (see Procedural Notes #3), place 200 μ L of reagent grade water to the well designated as the water blank. Blank or zero the plate reader against air or a water blank well. Read the OD of each well at 450 nm (and 650 nm reference, if dual beam). The OD values should be measured within 30 minutes after the addition of Stopping Solution.

Results

1. Calculate the mean OD values for the duplicates of Calibrator, Controls, and patient samples.
2. Divide the assigned value of the Calibrator (printed on the vial label) by the mean OD of the Calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the mean OD for each of the Controls and patient samples by the conversion factor to obtain the Units (U) for each sample.

$$\text{Conversion Factor} = \frac{\text{Assigned Calibrator Value}}{\text{Mean Calibrator OD}}$$

$$\text{Sample Unit (U) Value} = \text{Conversion Factor} \times \text{OD of the sample.}$$

4. The Conversion Factor must be calculated for each assay run. Using a Conversion Factor from another assay will invalidate the results.
5. If the sample OD is higher than the upper limit of the plate reader, the sample should be further diluted 1:10 in APA Sample Diluent (i.e., add 10 μ L sample to 90 μ L APA sample diluent). Then proceed with the 1:101 dilution and re-assay to obtain a value. Multiply the resulting assay Unit by 10 to obtain the calculated Unit value.

Quality Control

1. The mean OD value of the Calibrator should be at least 0.400 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator OD readings of less than 0.400 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
2. The mean OD of the reagent control should be less than 0.100. Readings greater than 0.100 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The APA Unit (U) obtained for the Control Sera should be within the ranges indicated on the vial labels.
4. OD values for the duplicates of the Controls or patient samples should be within 20% of each other for samples with OD/absorbance readings greater than 0.200. If not, re-run the patient sample in duplicate.

NORMAL RANGE

Serum samples from 100 healthy blood donors were tested for IgG anti-polymer antibodies. The normal range was established as less than 30 Units (U).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Random Donor Controls:

Serum samples from 100 random blood donors were assayed for the presence of anti-polymer antibodies. Using the established cut-off of 30 Units (U), this normal population showed a specificity of 75%. This rate correlates with a previously published study² where the presence of anti-polymer antibodies were found in 19% of random donor controls.

Clinical Sensitivity:

Systemic Lupus Erythmatosis (SLE):

Serum samples from 93 patients diagnosed with Systemic Lupus Erythmatosis (SLE) that were collected in sequential order at a Rheumatology clinic were analyzed in the APA ELISA to determine the prevalence of anti-polymer antibodies. The presence or absence of FMS for each patient was not determined. The mean value was 16.4 Units (U) with a positive rate of 11.8%.^{2,5}

Rheumatoid Arthritis (RA):

Serum samples from 71 patients diagnosed with Rheumatoid Arthritis (RA) that were collected in sequential order at a Rheumatology clinic were analyzed in the APA ELISA to determine the prevalence of anti-polymer antibodies. The presence or absence of FMS for each patient was not determined. The mean value was 31.9 Units (U) with a positive rate of 28.2%.^{2,6}

Fibromyalgia Syndrome (FMS):

Serum samples from 16 patients diagnosed with Fibromyalgia Syndrome (FMS) were analyzed in the APA ELISA to determine the prevalence of anti-polymer antibodies. The mean value was 54.3 Units (U) with a positive rate of 43.8%.²

Summary:

	Random Donors	SLE	RA	FMS
#of Samples (n)	100	93	71	16
Mean (Units)	36.9	16.4	31.9	54.3
% Positive	25%	11.8%	28.2%	43.8%

Precision:

Two samples with known IgG APA values (one high and one low) were assayed in 23 replicates on three different plates. The mean intraassay and interassay percent coefficients of variation (%CVs) are presented in the following table. The reported intraassay coefficient of variation is the mean of the three separate intraassay CVs. Interassay CV is the coefficient of variation obtained from three plates from one lot.

IgG APA Value	Mean Intra-assay CV	Mean Inter-assay CV
High (254 Units)	6.7%	6.6%
Low (40 Vnits)	7.5%	4.0%

LIMITATIONS OF THE TEST

The IgG APA 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.

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.

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA

In-vitro-Diagnostikum

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) für die semiquantitative Bestimmung von IgG-Anti-Polymer-Antikörpern in Humanserum.

ANWENDUNGSGEBIET

Das patentierte APA-Testkit ist ein semiquantitativer ELISA, mit dem IgG-Anti-Polymer-Antikörper (APA) nachgewiesen und bestimmte Fibromyalgiepatienten erkannt werden können. Das APA-Testkit ist für die folgenden Verwendungszwecke bestimmt: 1) Als diagnostisches Hilfsmittel bei Patienten mit Symptomen und Anzeichen des Fibromyalgiesyndroms, 2) als Hilfsmittel für die Unterscheidung von Fibromyalgiepatienten von Patienten, die an anderen Autoimmunkrankheiten erkrankt sind, und 3) als Hilfsmittel bei der Identifizierung einer Untergruppe von Fibromyalgiepatienten, die ein einzigartiges, charakteristische Immunantwort aufweisen.

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. Verdünnte Serumproben, Kalibratoren und Kontrollen werden in Mikrovertiefungen, die mit Polymer beschichtet sind, inkubiert. Die Inkubation ermöglicht eine Reaktion der in den Proben enthaltenen Anti-Polymer-Antikörper mit der immobilisierten beschichteten Oberfläche. Nach dem Auswaschen nicht gebundener Proteine werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, für Human-IgG spezifische Antikörper zugefügt, die mit den Polymer-gebundenen Antikörpern komplexieren. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid enthält (H_2O_2) als chromogenes Substrat bestimmt. In den Vertiefungen entwickelt sich eine Farbe mit einer der Konzentration der Anti-Polymer-Antikörper im Serum proportionalen Intensität.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD oder Extinktion) in allen Vertiefungen mit einem Spektralphotometer. Es wird ein Kalibrationsserum mitgeliefert, dessen IgG-Anti-Polymer-Antikörper-Konzentration in Einheiten angegeben ist. Die Division der Konzentration der Kalibratorseren durch den OD-Wert des Kalibrators liefert einen Umrechnungsfaktor. Die OD-Werte der anderen Proben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der IgG-Anti-Polymer-Antikörper in Einheiten zu erhalten.

REAGENZIEN

Bei 2 - 8°C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jedes APA-ELISA-Testkit (96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien:

- 96 Mikrovertiefungen, beschichtet mit APA-Antikörpern (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen) mit Halterung
- 2 Fläschchen (60 mL) APA-Probenverdünner (grüne Lösung)
- 1 Fläschchen (0,250 mL) APA-Kalibratorserum (humanen Ursprungs)*
- 1 Fläschchen (0,250 mL) APA-Positivkontrollserum (humanen Ursprungs)*
- 1 Fläschchen (0,250 mL) APA-Normalkontrollserum (humanen Ursprungs)*
- 1 Fläschchen (15 mL) APA-Antikörper-Lösung, HRP-konjugiert (Ziegen-Antihuman-IgG)
- 1 Fläschchen (15 mL) Einkomponentensubstrat (TMB/ H_2O_2); gebrauchsfertig
- 1 Fläschchen (15 mL) Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure)
- 2 Fläschchen (30 mL) Waschkonzentrat (33X PBS/Tween 20)

*** ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung der in diesem Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV, Syphilis und HIV 1 u. 2 reagierten. Trotzdem sollten alle humanen Blutprodukte 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. Das Einkomponentensubstrat kann Augen- und Hautreizungen verursachen. Absorption durch die Haut ist möglich. Beim Umgang mit dem Substrat stets Handschuhe tragen und anschließend gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
7. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R 22). Reizt die Augen und die Haut (R 36/38). Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden (S 24/25). Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren (S 26). Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S 36).

PROBENNAHME UND –VORBEREITUNG

Serum ist die bevorzugte Probenmatrix. Nach der Probengewinnung durch Venenpunktion sollte das Serum von den Zellen durch Zentrifugation getrennt werden, sobald das Blut geronnen ist. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2 - 8°C aufzubewahren. Sollen die Proben länger als 72 Stunden aufbewahrt werden, müssen diese bei mindestens -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Hämolyisiertes, ikterisches oder lipämisches Serum 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

Anti-Polymer-Antikörper-ELISA (APA-ELISA); eine vollständige Liste finden Sie unter „Reagenzien“.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der PBS/Tween 20-Waschlösung (1 L)
- Messzylinder
- Präzisionspipetten für Volumen zwischen 10 µL und 1000 µL mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr und Verdünnungsröhrchen zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit teilweise zugeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, bzw. ein automatisches oder halbautomatisches Plattenwaschsystem
- Einmalhandschuhe
- Spektralphotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm (mit 650 nm als Referenzwellenlänge, sofern verfügbar)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig mit 100 µL beschickt werden können
- Reagenzreservoir zur leichteren Abgabe der Reagenzien mit Mehrkanalpipetten

Hinweise zur Durchführung

1. Serumproben und Kitreagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen und gut durchmischen - Schaumbildung vermeiden. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren dürfen erst kurz vor dem Bestimmungsansatz verdünnt werden.
3. Auf jeder Platte muss für jeden Lauf ein Luftleerwert (Gerät vor dem endgültigen Ablesen der Vertiefungen gegen Luft auf Null stellen) oder ein Substratleerwert (optional) mitgeführt werden. In die Vertiefung für den Substratleerwert dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden in die Vertiefung für den Substratleerwert direkt vor dem Ablesen der Mikrotiterplatte im Spektralphotometer 200 µL analysenreines Wasser pipettiert. Das Plattenlesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen Luft oder den Substratleerwert 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 den Substratleerwert reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn überschüssiges PBS/Tween 20 nicht restlos entfernt wird, kann es zu einer ungleichmäßigen Farbentwicklung in der Substratlösung kommen.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der acht Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichförmigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Vertiefungen.
7. Die Zeitangaben müssen bei allen Schritten sorgfältig eingehalten werden. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von 5 Minuten auf die Platte gegeben 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 Raumtemperatur (18-26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der primären Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden. Nur das erforderliche Volumen an Reagenz abgießen oder abpipettieren. Überflüssige HRP-konjugierte Antikörperlösung oder Einkomponentensubstratlösung nicht in die Originalflaschen zurückgeben.
12. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
13. Die Reagenzien verschiedener Kit-Chargen nicht miteinander vermischen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschlösung (PBS/Tween 20): 30 mL Waschkonzentrat (33X PBS/Tween 20) abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 Liter auffüllen. 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 sonstigen Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Bei Kalibrator und Kontrollen Doppelbestimmungen durchführen. Es wird empfohlen, bei Patientenproben ebenfalls Doppelbestimmungen durchzuführen. Mindestens eine Vertiefung sollte für eine Reagenzkontrolle verwendet werden; dazu wird APA-Probenverdünner ohne Serum oder Plasma in eine Vertiefung übertragen. Diese Vertiefung wird in den folgenden Testschritten wie Probenvertiefungen behandelt.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und in dem mitgelieferten Säckchen aufbewahren.

3. Eine 1:101 Verdünnung von Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben im APA-Probenverdünner (grüne Lösung) herstellen; z.B. 10 µL Probe zu 1000 µL APA-Probenverdünner entspricht einer Probenverdünnung von 1:101.
4. Je 100 µL der verdünnten Kalibratoren, Kontrollen bzw. Patientenproben in eine Mikrovertiefung pipettieren.
5. 100 µL des APA-Probenverdünners in die für die Reagenzkontrolle vorgesehene Vertiefung pipettieren.
6. 60 Minuten bei 18-26°C inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen oder Absaugen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
7. Viermal mit PBS/Tween 20-Waschlösung waschen. Die Plattenhalterung halten und oben und unten zusammendrücken, um die Vertiefungen während des Waschens zurückzuhalten. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Jede Vertiefung vollständig mit Waschlösung füllen, und die Waschlösung dann in einen Behälter oder ein Becken ausgießen oder ausschleudern. Diesen Vorgang noch drei weitere Male wiederholen. Die Vertiefungen umdrehen und auf saugfähigem Papier zum vollständigen Entfernen der Waschlösung abtupfen. Die Vertiefungen dürfen zu keiner Zeit austrocknen.
8. 100 µL HRP-konjugierte Antikörperlösung (blaue Lösung) in alle Vertiefungen geben. 30 Minuten bei 18-26°C inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen oder Absaugen der Mikrovertiefungen entfernt.
9. Viermal wie in Schritt 7 beschrieben mit PBS-Tween 20-Waschlösung waschen.
10. Jede Vertiefung mit 100 µL Einkomponentensubstratlösung füllen und 30 Minuten bei 18-26°C 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 (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung beendet. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Nach Zugabe der Stopplösung schlägt blaue Substratlösung nach gelb um, während bisher farblos gebliebene Lösungen farblos bleiben.
12. Bei Verwendung eines Substratleerwerts (siehe Hinweise zur Durchführung, Punkt 3) 200 µL analysenreines Wasser in die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung geben. Das Plattenlesegerät gegen Luft oder gegen einen Substratleerwert nullabgleichen. 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 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmt werden.

Ergebnisse

1. Den OD-Mittelwert aus den Doppelbestimmungen von Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben errechnen.
2. Die auf dem Fläschchenetikett angegebene Konzentration des Kalibrators durch den OD-Mittelwert des Kalibrationsserums dividieren, um den Umrechnungsfaktor zu erhalten.
3. Die OD-Mittelwerte der einzelnen Kontrollen und Patientenproben mit dem Umrechnungsfaktor multiplizieren, um für jede Probe die Konzentrationswerte in Einheiten (E) zu erhalten.

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{Nomineller Kalibratorwert}}{\text{Mittlere OD des Kalibrators}}$$

$$\text{Einheiten der Probe (E)} = \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{OD der Probe.}$$

4. Der Umrechnungsfaktor muss für jeden Testlauf berechnet werden. Anwendung eines Umrechnungsfaktors eines anderen Tests führt zu unbrauchbaren Ergebnissen.
5. Wenn der OD-Wert der Probe über der Obergrenze des Plattenlesegeräts liegt, sollte die Probe mit APA-Probenverdünner 1:10 weiter verdünnt werden (d.h. 10 µL Probe zu 90 µL APA-Probenverdünner geben). Anschließend mit der 1:101 Verdünnung weiterarbeiten und einen neuen Assay-Wert bestimmen. Das Ergebnis mit 10 multiplizieren, um den berechneten Wert für die Einheiten (E) zu erhalten.

Qualitätskontrolle

1. Um die Zuverlässigkeit des Kits zu bestätigen, sollte der OD-Mittelwert des Kalibrators mindestens 0,400 betragen. Ist die OD des Kalibrators niedriger als 0,400, so ist dies ein Hinweis dafür, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Die durchschnittliche OD der Reagenzkontrolle sollte geringer als 0,100 sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
3. Die mit dem Kontrollserum erhaltene APA-Einheit (E) muss innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Sollbereichs liegen.
4. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen von Kontrollen oder Patientenproben um nicht mehr als 20% voneinander abweichen. Falls diese Bedingung nicht erfüllt ist, die Patientenprobe nochmals im Doppelansatz testen.

NORMALBEREICH

Serumproben von 100 gesunden Blutspendern wurden auf IgG-Anti-Polymer-Antikörper getestet. Werte unter 30 Einheiten (E) wurden als Normalbereich definiert.

GRENZEN DES TESTS

Die IgG-APA-Konzentrationen, die mit diesem Test erhalten werden, sind als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Jeder Arzt muss dieses Ergebnis unter Einbeziehung des Krankheitsablaufes, der Patientendaten, des körperlichen Befundes und anderen diagnostischen Untersuchungen betrachten.

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.

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Dosage immunoenzymatique (ELISA) pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgG dépolymérisés dans le sérum humain.

UTILISATION ENVISAGÉE

Le kit de test breveté APA est un ELISA semi-quantitatif qui détecte les anticorps IgG dépolymérisés (APA) et identifie certains patients fibromyalgiques. L'utilisation du kit de test APA est indiquée comme : 1) aide au diagnostic des patients présentant les symptômes et les signes du syndrome de la fibromyalgie, 2) aide à la différenciation des patients fibromyalgiques des patients atteints d'autres maladies auto-immunes, et 3) aide à l'identification d'un sous-groupe de patients fibromyalgiques présentant une réponse immunitaire à caractéristique unique.

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Les échantillons de sérum, l'étalon et les contrôles dilués sont incubés dans des micropuits enduits de polymères. L'incubation permet aux anticorps dépolymérisés présents dans les échantillons de réagir avec la surface enduite immobilisée. Après élimination par lavage des protéines non liées, les anticorps spécifiques de IgG humaine couplés à une peroxydase du raifort (PR) sont alors ajoutés formant ainsi des complexes avec les anticorps fixés aux polymères. Après un deuxième lavage, le conjugué enzyme-anticorps lié est dosé par addition d'une unique solution contenant du tétraméthylbenzène (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à titre de substrat chromogène. La couleur se développe dans les puits à une intensité proportionnelle à la concentration d'anticorps dépolymérisés dans le sérum.

Le résultat s'obtient par lecture de la densité optique (DO ou absorbance) de chaque puits sur un spectrophotomètre. Un sérum étalon est fourni et la concentration d'anticorps IgG dépolymérisés est exprimée en unités. La division de la valeur de la concentration des sérums de l'étalon par la DO de cet étalon donne un facteur de conversion. Les lectures de DO des autres échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration des anticorps IgG dépolymérisés en Unités.

RÉACTIFS

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

Chaque kit de test ELISA APA pour 96 micropuits contient les réactifs suivants :

- 96 micropuits enduits d'antigène APA (12 barrettes de 8 puits), avec cadre
- 2 bouteilles (60 mL) de diluant pour échantillon APA (solution verte)
- 1 flacon (0,250 mL) d'étalon APA (origine humaine)*
- 1 flacon (0,250 mL) de contrôle positif APA (origine humaine)*
- 1 flacon (0,250 mL) de contrôle normal APA (origine humaine)*
- 1 bouteille (15 mL) de conjugué anticorps-APA HRP (chèvre anti-IgG humaine)
- 1 bouteille (15 mL) de substrat à un composant (TMB/ H_2O_2) ; prêt à l'emploi
- 1 bouteille (15 mL) de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N)
- 2 bouteilles (30 mL) de concentré de lavage (33x 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, anti-syphilis et anti-HIV 1 & 2 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. Le substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption à travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources d'ignition. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
7. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante : Nocif en cas d'ingestion (R 22). Irritant pour les yeux et la peau (R 36/38). Éviter le contact avec la peau et les yeux (S 24/25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). Porter un vêtement de protection approprié (S 36).

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Réaliser les dosages sur sérum de préférence. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le sérum immédiatement séparé des cellules par centrifugation après la formation du caillot. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2-8 °C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20 °C ou moins. Éviter des cycles de congélation-décongélation répétés. Ne pas utiliser de sérum hémolysé, ictérique ou lipémique, au risque d'obtenir des résultats aberrants. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni :

ELISA anticorps dépolymérisés (APA) ; voir « Réactifs » pour la liste complète.

Matériel requis mais non fourni :

- Eau pure pour analyse (1 L) pour préparer la solution mère PBS/Tween 20
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 10 µL et 1 000 µL avec embout approprié
- Verrerie ou tubes de dilution convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants à usage unique
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire la densité optique à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanal capables de distribuer 100 µL dans huit puits simultanément
- Réservoirs de réactifs pour faciliter leur distribution par les pipetteurs multicanaux

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de sérum et les réactifs à température ambiante (18-26°C) et bien agiter avant l'emploi ; 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 vide sur l'air (mettre l'instrument à zéro sur l'air avant la lecture finale des puits) ou un vide sur l'eau (optionnel) doit être installé sur chaque plaque avec chaque série. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté au puits d'eau à blanc. Pour un puits d'eau à blanc, ajouter 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 mis à zéro ou « à vide » sur l'air ou sur le 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 microplaque.
5. **IMPORTANT** : L'élimination imparfaite des résidus PBS/Tween 20 risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de distribuer dans huit 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 à la microplaque en moins de 5 minutes. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Pour toutes les incubations, la période d'incubation débute dès que l'ajout du réactif ou de l'échantillon est terminé.
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 de 18-26°C peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés. Verser ou pipetter uniquement le volume de réactif nécessaire. Ne pas remettre les excédents de conjugué anticorps-APA HRP ou de substrat à un composant dans leurs bouteilles d'origine.
12. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de leur date de péremption.
13. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de lots différents.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Solution mère (PBS/Tween 20) : Mesurer 30 mL de concentré de lavage (33x PBS/Tween 20) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution de lavage inutilisée au réfrigérateur, entre 2-8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou autre.

Procédure de dosage

1. Étalons et contrôles en double. Il est également recommandé d'effectuer des analyses en parallèle de chaque échantillon patient. Au moins un puits doit être utilisé pour le réactif à blanc : ajouter à un puits du diluant pour échantillon APA sans sérum ou plasma. Ce puits sera traité de la même manière que les puits d'échantillons dans les étapes de dosage ultérieures.
2. Retirer du cadre toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Diluer l'étalon, les contrôles et les échantillons patient au 1/101e dans le diluant pour échantillon APA (solution verte). Exemple : 10 µL d'échantillon et 1 000 µL de diluant pour échantillon APA égale une dilution d'échantillon au 1/101e.
4. Ajouter 100 µL d'étalon, de contrôles et d'échantillons patient dilués aux micropuits appropriés.
5. Ajouter 100 µL de diluant pour échantillon APA au puits de réactif à blanc.

6. Laisser incuber 60 minutes entre 18-26°C. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter ou aspirer le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
7. Laver 4 fois avec la solution mère PBS/Tween 20. Tenir le cadre de la microplaque et faire pression sur la partie supérieure et la partie inférieure afin de retenir les micropuits au cours du lavage. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Remplir complètement chaque puits de solution mère, puis éliminer ou secouer la solution dans un conteneur ou un évier. Répéter trois fois de plus cette procédure. Retourner les puits sur du papier absorbant et tapoter pour éponger les résidus de solution mère. Ne laisser à aucun moment les puits se dessécher.
8. Ajouter 100 µL de conjugué anticorps-APA HRP (solution bleue) à tous les puits. Incuber pendant 30 minutes entre 18-26°C. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter ou aspirer la solution de conjugué.
9. Laver 4 fois avec la solution mère PBS/Tween 20 ainsi que décrit à l'étape 7.
10. Ajouter 100 µL de substrat à un composant dans chaque puits et laisser incuber 30 minutes entre 18-26°C. 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 la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. Les réactions couleur de la solution substrat bleue deviennent jaune et la solution incolore reste incolore lorsque la solution d'arrêt est ajoutée.
12. Si un puits d'eau à blanc est utilisé (voir les Remarques sur la procédure n° 3), placer 200 µL d'eau pure pour analyse au puits désigné comme puits d'eau à blanc. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur l'air ou sur un puits d'eau à blanc. Lire la DO de chaque puits à 450 nm (et à la référence 650 nm si à double faisceau). La DO doit être mesurée dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Résultats

1. Calculer la DO moyenne des doublons d'étalon, de contrôles et d'échantillons patient.
2. Pour calculer le facteur de conversion, diviser la concentration de l'étalon (imprimée sur l'étiquette du flacon) par la DO moyenne du sérum étalon.
3. Multiplier la DO moyenne de chacun des contrôles et échantillons patient par le facteur de conversion pour obtenir les Unités (U) pour chaque échantillon.

$$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Concentration de l'étalon}}{\text{DO moyenne de l'étalon}}$$

Valeur en Unités (U) de l'échantillon = Facteur de conversion X DO de l'échantillon.

4. Le facteur de conversion doit être calculé à chaque série de dosages. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage invaliderait les résultats.
5. Si la DO de l'échantillon dépasse la limite supérieure du lecteur de plaque, l'échantillon doit être dilué de 1/10e de plus dans le diluant pour échantillon APA (par exemple : ajouter 10 µL d'échantillon à 90 µL de diluant pour échantillon APA). Diluer ensuite au 1/101e et procéder de nouveau au dosage pour obtenir une valeur. Multiplier l'unité de dosage qui en résulte par 10 pour obtenir la valeur en Unités calculée.

Contrôle qualité

1. La DO moyenne de l'étalon doit être d'au moins 0,400 pour valider le bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,400 indique que le kit est périmé.
2. La DO moyenne obtenue pour le réactif à blanc doit être inférieure à 0,100. Une valeur supérieure à 0,100 peut indiquer que le réactif a été contaminé ou que la plaque a été mal lavée.
3. L'Unité APA (U) obtenue pour les sérums de contrôle doit être dans les plages indiquées sur les étiquettes des flacons.
4. Les valeurs de DO pour les doubles des contrôles ou des échantillons patient ne doivent pas différer de plus de 20 % pour les échantillons dont les résultats d'absorbance/DO sont supérieurs à 0,200. Si ce n'est pas le cas, exécuter à nouveau la série des échantillons patient en double.

PLAGE NORMALE

100 échantillons de sérum provenant de donneurs de sang sains ont été testés pour les anticorps IgG dépolymérisés. La plage normale a été établie à moins de 30 Unités (U).

LIMITATIONS DU TEST

Les valeurs obtenues d'anticorps IgG dépolymérisés 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.

Garantie

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe 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 : telephone +1-303-457-4345 ; télécopie +1-303-457-4519 ; Email techsupport@corgenix.com ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA

Para uso diagnóstico *in vitro*

Un enzoinmunoensayo (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG antipolimerales en suero humano.

INDICACIONES

El equipo de prueba patentado APA es un ELISA semicuantitativo que detecta los anticuerpos IgG antipolimerales (APA) e identifica a determinados enfermos de fibromialgia. El equipo de prueba APA está indicado para los siguientes usos: 1) como ayuda para el diagnóstico de pacientes que presentan los síntomas y signos propios del síndrome de fibromialgia, 2) como ayuda para la diferenciación entre enfermos de fibromialgia y enfermos con otras patologías autoinmunes, y 3) como ayuda para la identificación de un subgrupo de enfermos de fibromialgia que muestran una respuesta inmune singular.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero, el calibrador y los controles se incuban en micropocillos con un revestimiento de polímero. La incubación permite que los anticuerpos antipolimerales presentes en las muestras reaccionen con la superficie revestida inmovilizada. Tras la eliminación, mediante lavado, de las proteínas no unidas, se añaden anticuerpos específicos para IgG humana marcados con peroxidasa (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos al polímero. 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 sérica de anticuerpos antipolimerales.

Los resultados se obtienen leyendo la densidad óptica (DO o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministra un suero calibrador con las concentraciones de anticuerpos IgG antipolimerales expresadas en unidades. Dividiendo el valor de la concentración de los sueros calibradores por la DO de dicho calibrador se obtiene un factor de conversión. Las lecturas de DO de las demás muestras se multiplican por el factor de conversión para obtener las concentraciones de anticuerpos IgG antipolimerales en Unidades.

REACTIVOS

Consérvelos a entre 2-8°C. No los congele.

Cada kit de ELISA de 96 micropocillos APA contiene los siguientes reactivos

- 96 micropocillos APA con revestimiento de antígeno (12 tiras de 8 pocillos), con gradilla
- 2 envases (60 mL) de diluyente de muestras APA (solución verde)
- 1 frasco (0,250 mL) de calibrador (origen humano) APA*
- 1 frasco (0,250 mL) de control positivo (origen humano) APA*
- 1 frasco (0,250 mL) de control normal (origen humano) APA*
- 1 envase (15 mL) de solución de anticuerpos APA conjugada con HRP (anti-IgG humana de cabra)
- 1 envase (15 mL) de sustrato de un componente (TMB y H₂O₂); listo para su uso
- 1 envase (15 mL) de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N)
- 2 envases (30 mL) de concentrado de lavado (PBS/Tween 20 33x)

*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro

1. Los materiales de origen humano empleados para preparar el calibrador y los controles incluidos con este equipo se han examinado y resultaron negativos en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV), de la sífilis y de los VIH 1 y 2 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 equipo 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. Es posible la absorción a través de la piel. Utilice guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente 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: Nocivo por ingestión (R 22). Irrita los ojos y la piel (R 36/38). Evítese el contacto con los ojos y la piel (S 24/25). En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico (S 26). Úsese indumentaria protectora adecuada (S 36).

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El suero es la matriz de muestra recomendada. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2-8°C. Cuando las muestras deban almacenarse durante más de 72 horas, deben congelarse a -20°C o menos. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida. No utilice suero hemolizado, icterico o lipémico, ya que produce resultados anómalos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos

Análisis ELISA de anticuerpos antiapolimerales (APA); consulte la lista completa en la sección «Reactivos».

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua para reactivos para preparar solución de lavado PBS/Tween 20 (1 L)
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 10 y 1000 µL con puntas apropiadas.
- Diverso material de vidrio o tubos de dilución adecuados para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o 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 encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de administrar 100 µL a ocho pocillos simultáneamente
- Depósitos de reactivo para facilitar la administración de reactivos mediante pipetas multicanal

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (entre 18-26°C) 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 de prueba deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada placa procesada debe incluirse un pocillo testigo de aire (programe el aparato a cero respecto a aire antes de la lectura final de los pocillos) o un pocillo testigo de agua (opcional). No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo al pocillo testigo de agua. En su lugar, añada 200 µL de agua para reactivos a este pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o a borrarse con respecto a aire o al 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 de placas de microvaloración automático.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS/Tween 20, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de administrar las soluciones a ocho pocillos simultáneamente. 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 a la placa en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser superior al número que puede añadirse en este período de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza al acabar de añadir los reactivos o las muestras.
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 18-26°C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios. Vierta o pipetee solamente el volumen necesario de reactivos. No devuelva los volúmenes sobrantes de solución de anticuerpos conjugada con HRP ni de solución de sustrato de un componente a los envases originales.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. No utilice reactivos provenientes de equipos con diferentes números de lote.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Solución de lavado (PBS/Tween 20): Mida 30 mL de concentrado para lavado (PBS/Tween 20 33x) 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 2-8°C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o de otro tipo.

Procedimiento del ensayo

1. Analice el calibrador y los controles por duplicado. Es aconsejable realizar determinaciones por duplicado de cada muestra de paciente. Debe procesarse al menos un pocillo como control de reactivo, para lo que se añade a un pocillo diluyente de muestras APA sin suero o plasma. Este pocillo se tratará de la misma forma que los pocillos de muestras en los siguientes pasos del ensayo.
2. Retire de la gradilla las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.

3. Prepare una dilución 1:101 del calibrador, los controles y las muestras de los pacientes en el diluyente de muestras APA (solución verde), por ejemplo, 10 µL de muestra añadidos a 1000 µL de diluyente de muestras APA es igual a una dilución de muestra de 1:101.
4. Añada 100 µL de calibrador, controles y muestras de pacientes diluidos a los micropocillos correspondientes.
5. Añada 100 µL de diluyente de muestras APA al pocillo de control de reactivo.
6. Incube durante 60 minutos a entre 18-26°C. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche o aspire el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
7. Lave 4 veces con solución de lavado PBS/Tween 20. Agarre la gradilla de las placas y presiónela por las partes superior e inferior para retener los micropocillos durante el lavado. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. Llene por completo todos los pocillos con solución de lavado y, a continuación, extraiga o sacuda la solución de lavado para echarla a un recipiente o un fregadero. 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. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen en ningún momento.
8. Añada 100 µL de solución de anticuerpos conjugada con HRP (solución azul) a todos los pocillos. Incube durante 30 minutos a entre 18-26°C. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche o aspire la solución de conjugado.
9. Lave 4 veces con solución de lavado PBS/Tween 20 como en el paso 7.
10. Añada 100 µL de solución de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 30 minutos a entre 18-26°C. Añada 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 la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad de añadido del sustrato. Las reacciones de color del sustrato azul se volverán amarillas y la solución incolora permanecerá igual al añadir solución de parada.
12. Si se utiliza un pocillo testigo de agua (consulte las Notas sobre el procedimiento, n.º 3), dispense 200 µL de agua para reactivos en el pocillo designado como testigo de agua. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a aire o a un pocillo testigo de agua. Lea la DO de cada pocillo a 450 nm (y a referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble). Los valores de la DO deben leerse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Resultados

1. Calcule los valores medios de la DO de los duplicados del calibrador, los controles y las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor asignado del calibrador (impreso en la etiqueta del frasco) por el valor medio de la DO del suero calibrador.
3. Para obtener las Unidades (U) de cada muestra, multiplique los valores medios de la DO de cada uno de los controles y de las muestras de pacientes por el factor de conversión.

$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Valor asignado del calibrador}}{\text{Valor medio de la DO del calibrador}}$$

$$\text{Valor de las Unidades de la muestra (U)} = \text{Factor de conversión} \times \text{valor de la DO de la muestra.}$$

4. 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.
5. Si la DO de la muestra es mayor que el límite superior del lector de placas, la muestra debe diluirse de nuevo a 1:10 en diluyente de muestras APA (esto es, añada 10 µL de muestra a 90 µL de diluyente de muestras APA). A continuación, proceda con la dilución 1:101 y vuelva a realizar el análisis para obtener un valor. Multiplique las Unidades resultantes del análisis por 10 para obtener el valor calculado en Unidades.

Control de calidad

1. El valor medio de la DO del calibrador debe ser 0,400 como mínimo para garantizar que el equipo funciona adecuadamente. Las lecturas de DO del calibrador inferiores a 0,400 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
2. La DO media del control de reactivos debe ser inferior a 0,100. Las lecturas superiores a 0,100 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
3. Las Unidades de APA (U) obtenidas en los sueros de control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del frasco.
4. Los valores de la DO de los duplicados de los controles o de las muestras de los pacientes deben diferir entre sí menos de un 20% en el caso de muestras con lecturas de DO/absorbancia superiores a 0,200. Si no es así, vuelva a procesar la muestra de paciente por duplicado.

RANGO NORMAL

Se comprobaron los anticuerpos IgG antipolimerales de las muestras de suero de 100 donantes de sangre sanos y se estableció el rango normal a menos de 30 Unidades (U).

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos IgG APA 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.

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.

Anti-Polymer Antibody (APA) ELISA

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*

Un dosaggio immunoenzimatico ELISA per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-polimero della classe delle IgG nel siero umano.

USO PREVISTO

Il kit brevettato per il dosaggio degli APA è un dosaggio semiquantitativo ELISA in grado di rilevare gli anticorpi anti-polimero (APA) della classe delle IgG e di identificare determinati pazienti affetti da fibromialgia. Il kit per il dosaggio degli APA è previsto per l'uso 1) come ausilio diagnostico nel caso di pazienti che accusano sintomi e i segni di sindrome da fibromialgia, 2) come ausilio nella differenziazione dei pazienti affetti da fibromialgia da quelli affetti da altre malattie autoimmuni e 3) come ausilio nell'identificazione di un sottogruppo di pazienti affetti da fibromialgia con una risposta immunologica caratteristica e unica.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. I campioni di siero, il calibratore e i controlli diluiti vengono incubati in micropozzetti rivestiti di polimero. L'incubazione permette agli anticorpi anti-polimero presenti nei campioni di reagire con la superficie rivestita immobilizzata. Una volta eliminate mediante lavaggio le proteine non legate, gli anticorpi specifici per le IgG umane, marcati con perossidasi di rafano (HRP) vengono aggiunti per formare dei complessi con gli anticorpi legati al polimero. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene misurato mediante aggiunta di una singola soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2) come substrato cromogeno. Nei pozzetti si sviluppa una colorazione di intensità proporzionale alla concentrazione sierica degli anticorpi anti-polimero.

I risultati si ottengono leggendo mediante uno spettrofotometro la densità ottica (densità ottica o assorbanza) di ciascun pozzetto. Viene fornito un calibratore con la concentrazione di anticorpi anti-polimero della classe delle IgG espressa in Unità. Per ricavare un fattore di conversione basta dividere il valore di concentrazione dei calibratori per la 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 IgG anti-polimero espresse in Unità.

REAGENTI

Conservare a 2-8 °C. Non congelare.

Ogni kit ELISA per il dosaggio degli APA (96 micropozzetti) contiene i seguenti reagenti:

- 96 micropozzetti rivestiti con antigene APA (12 strisce di 8 pozzetti), con telaio
- 2 flaconi (60 ml) di diluente per campione APA (soluzione verde)
- 1 fiala (0,250 ml) di calibratore per APA (di origine umana)*
- 1 fiala (0,250 ml) di controllo positivo per APA (di origine umana)*
- 1 fiala (0,250 ml) di controllo normale per APA (di origine umana)*
- 1 flacone (15 ml) di soluzione anticorpale APA (anticorpi di capra anti-IgG umane) coniugata con HRP
- 1 flacone (15 ml) di substrato monocomponente (TMB/ H_2O_2); pronto per l'uso
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico)
- 2 flaconi (30 ml) di concentrato di lavaggio (33X PBS/Tween 20)

*** ATTENZIONE: contiene sodio azide**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. I materiali di origine umana usati per la preparazione del calibratore e dei controlli inclusi in questo kit sono stati analizzati in osservanza dei requisiti della FDA e sono risultati negativi per gli anticorpi anti-HBsAg, anti-HCV, anti-sifilide e anti-HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti i derivati di sangue umano, inclusi i campioni prelevati dai 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 dare luogo alla formazione di 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. Il substrato monocomponente può essere irritante per gli occhi e la cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Durante la manipolazione del substrato, indossare un paio di guanti e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
7. Alcuni componenti sono etichettati come segue. Nocivo per ingestione (R 22). Irritante per gli occhi e la pelle (R 36/38). Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle (S 24/25). In caso di contatto con gli occhi lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico (S 26). Usare indumenti protettivi adatti (S 36).

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero costituisce la matrice del campione più idonea. Il sangue va raccolto per venipuntura ed il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo la coagulazione. Se l'analisi non viene eseguita immediatamente, i campioni vanno conservati 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. Per evitare risultati errati, non utilizzare campioni emolizzati, itterici o lipemici. Campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima dell'analisi.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit ELISA per il dosaggio degli anticorpi anti-polimero (APA); per un elenco completo, vedere la sezione "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata per la preparazione della soluzione di lavaggio PBS/Tween 20 (1 litro)
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di misurare tra 10 e 1000 µL, con puntali appropriati
- Vetreria assortita o provette per diluizione adatte a piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con punta parzialmente tagliata per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per piastra in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanale per la dispensazione simultanea di 100 µL in otto pozzetti
- Contenitori per i reagenti adatti per agevolare la dispensazione dei reagenti mediante le pipette multicanale

Note procedurali

1. Portare i campioni di siero e i reagenti del kit a temperatura ambiente (18-26°C) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni del calibratore, dei controlli e dei campioni vanno eseguite solo immediatamente prima del dosaggio.
3. Su ciascuna piastra, per ogni sessione di analisi, è necessario eseguire un bianco contro aria (azzeramento dello strumento contro l'aria prima della lettura finale dei pozzetti) o predisporre un pozzetto bianco (con acqua, opzionale). Al pozzetto bianco 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 di piastre va programmato su zero, azzerato contro l'aria o contro il pozzetto bianco.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita 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. È anche possibile usare un sistema di lavaggio automatico delle piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - Eventuali residui di PBS/Tween 20 possono causare un sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di effettuare la dispensazione simultanea in otto pozzetti. Ciò aumenta la rapidità dell'analisi e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. È essenziale controllare con precisione il tempo di tutte le fasi dell'analisi. Tutti i calibratori, i controlli e i campioni vanno aggiunti alla piastra entro cinque minuti. Il numero dei campioni non deve superare il numero che può essere aggiunto entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia quando è terminata l'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e con la stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26°C) possono generare risultati errati.
11. Durante il prelievo delle aliquote dalle fiale, evitare la contaminazione dei reagenti. Versare o pipettare esclusivamente il volume di reagente necessario. Non rimettere i volumi in eccesso della soluzione anticorpale coniugata con HRP o del substrato monocomponente prelevati nelle fiale originali.
12. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
13. Non utilizzare componenti di kit da differenti lotti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio (PBS/Tween 20) - Misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS/Tween 20) e diluirlo a 1 litro 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°C. Gettare la soluzione se mostra segni di contaminazione microbica o di altro tipo.

Procedura di analisi

1. Analizzare il calibratore e i controlli in duplicato. Si consiglia di eseguire determinazioni in duplicato anche per ciascun campione da paziente. Almeno un pozzetto va analizzato come bianco reagente; a tale pozzetto si aggiunge del diluente per campione APA senza siero o plasma. Nelle successive fasi di analisi, questo pozzetto verrà trattato allo stesso modo dei pozzetti dei campioni.
2. Staccare dal telaio tutte le strisce di pozzetti non utilizzate e riporle nella busta in dotazione.
3. Preparare una diluizione 1:101 di calibratore, controlli e campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione APA (soluzione verde); ad esempio: 10 µL di campione aggiunto a 1000 µL di diluente per campione APA equivale ad una diluizione del campione pari a 1:101.

4. Aggiungere nei micropozzetti appropriati 100 µL di calibratore, controllo e campione diluiti.
5. Aggiungere 100 µL di diluente per campione APA al pozzetto bianco reagente.
6. Incubare per 60 minuti a 18-26°C. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare o aspirare la soluzione di campione. Evitare di contaminare con i campioni gli altri pozzetti.
7. Lavare 4 volte con soluzione di lavaggio PBS/Tween 20. Per trattenere i moduli dei micropozzetti durante il lavaggio, afferrarne il telaio ponendo un dito sul bordo inferiore e uno sul bordo superiore e comprimerlo. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Riempire completamente ciascun pozzetto con la soluzione di lavaggio, quindi rimuovere o drenare la soluzione di lavaggio scuotendo la piastra su un contenitore o un lavandino. Ripetere tre volte questa procedura. Capovolgere i pozzetti su carta assorbente e picchiettarli per farne fuoriuscire la soluzione di lavaggio residua. In tutte le fasi dell'analisi, evitare l'essiccazione dei pozzetti.
8. Dispensare 100 µL di soluzione anticorpale coniugata con HRP (soluzione blu) in tutti i pozzetti. Incubare per 30 minuti a 18-26°C. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare o aspirare la soluzione di coniugato.
9. Lavare 4 volte con soluzione di lavaggio PBS/Tween 20 come indicato al passaggio 7.
10. Dispensare 100 µL di substrato monocomponente in ciascun pozzetto e incubare a 18-26°C per 30 minuti. Aggiungere il substrato ai 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) a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità di dispensazione della soluzione di substrato. Con l'aggiunta della soluzione di arresto, il substrato blu diventa giallo, mentre la soluzione incolore rimane invariata.
12. Se si usa un pozzetto bianco, (vedere la nota procedurale n. 3), dispensare 200 µL di acqua distillata nel pozzetto opportuno. Azzerare il lettore di piastre contro l'aria o contro il pozzetto 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 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

1. Calcolare la densità ottica media per i duplicati del calibratore, dei controlli e dei campioni dei pazienti.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore assegnato del calibratore (stampato sull'etichetta della fiala) per la densità ottica media del calibratore.
3. Per ottenere le Unità (U) di ciascun campione, moltiplicare la densità ottica media di ciascun controllo e campione del paziente per il fattore di conversione.

$$\text{Fattore di conversione} = \frac{\text{Valore assegnato del calibratore}}{\text{Densità ottica media del calibratore}}$$

$$\text{Valore di Unità (U) del campione} = \text{Fattore di conversione} \times \text{Densità ottica del campione.}$$

4. Il fattore di conversione va calcolato per ciascuna analisi. L'uso di un fattore di conversione di un altro dosaggio invalida i risultati.
5. Se la densità ottica del campione risulta maggiore del limite superiore del lettore di piastre, il campione va diluito ulteriormente in rapporto 1:10 con diluente per campione APA (aggiungendo, cioè, 10 µL di campione a 90 µL di diluente per campione APA). Procedere quindi con la diluizione in rapporto 1:101 e rianalizzare per ottenere un valore. Moltiplicare per 10 le Unità ottenute nel dosaggio per ottenere il valore calcolato delle Unità.

Controllo di qualità

1. Il valore della densità ottica media del calibratore deve essere almeno 0,400 per garantire il corretto funzionamento del kit. Un risultato di densità ottica del calibratore minore di 0,400 indica che il kit non è più valido.
2. Il valore della densità ottica media 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. Le Unità (U) APA ottenute per i controlli devono rientrare nei range indicati sulle etichette delle rispettive fiale.
4. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati dai pazienti devono rimanere entro il 20% l'uno dall'altro per i campioni con valori di densità ottica/assorbanza maggiori di 0,200. In caso contrario, analizzare nuovamente in duplicato il campione prelevato dal paziente.

RANGE NORMALE

Per gli anticorpi IgG anti-polimero, sono stati analizzati campioni di siero da 100 donatori di sangue sani. Il range normale stabilito è risultato inferiore a 30 Unità (U).

LIMITI DEL TEST

Le concentrazioni di anticorpi IgG anti-polimero ottenute mediante il presente dosaggio servono solo come un ausilio nella diagnosi. Il medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altre procedure diagnostiche.











Garanzia

Si garantisce che le prestazioni di questo prodotto corrispondono a quanto descritto nel presente 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 1-303-457-4519, inviare un messaggio di posta elettronica all'indirizzo techsupport@corgenix.com o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Xiao YM, Russell IJ, Michalek JE, Wilson RB. Anti-Polymer Antibodies Identify a Large Subgroup of Fibromyalgia Syndrome Patients. Presentation; Myopain 2004.
2. Wilson RB, Gluck OS, Tesser JR, Rice JC, Meyer A, Bridges AJ. Anti-Polymer Antibody Reactivity in a Subset of Patients with Fibromyalgia Correlates With Severity. J Rheumatol 1999;26(2):402-407.
3. Bennett RM. Fibromyalgia and the Disability Dilemma. A New Era in Understanding a Complex, Multidimensional Pain Syndrome. Arthritis Rheum 1996;39(10):1627-1634.
4. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. Arthritis Rheum 1990;33(2):160-172.
5. Gladman, D.D. Urowitz M.B. Gough, J., MacKinnon, A. Fibromyalgia is a Major Contributor to Quality of Life in Lupus. J Rheumatol, 1997. 24(11): p. 2145-8
6. Wolfe, F. and K. Michaud, Severe Rheumatoid Arthritis (RA), Worse Outcomes, Co-Morbid Illness, and Sociodemographic Disadvantage Characterize RA Patients with Fibromyalgia. J Rheumatol, 2004. 31(4): p. 695-700

									
Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch	Expiry Date	Storage conditions	Harmful	Irritant	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity
(Bevollmächtigter)	(In-vitro-Diagnostikum)	(Charge)	(Verfallsdatum)	(Lagerbedingungen)	(Gesundheitsschädlich)	(Reizend)	(Biologisches Risiko)	Katalognummer	CE-Konformitätskennzeichnung
(Représentant agréé)	(Dispositif de diagnostic in vitro)	(Lot)	(Date de péremption)	(Conditions de stockage)	(Nocif)	(Irritant)	(Risque biologique)	Numero di catalogo	Conformità europea
(Representante autorizado)	(Dispositivo médico para diagnóstico in vitro)	(Lote)	(Fecha de caducidad)	(Condiciones de almacenamiento)	(Perjudicial)	(Irritante)	(Riesgo biológico)	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes
(Rappresentante autorizzato)	(Dispositivo medico-diagnostico in vitro)	(Lotto)	(Data di scadenza)	(Condizioni di conservazione)	(Nocivo)	(Irritante)	(Rischio biologico)	Número de catálogo	Conformidad europea



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

Manufactured by:

Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA
 © 2007

The APA Assay is covered by U.S. Patent No. 5,834,215
 European Patent No.0873518
 Australian Patent No. 710252
 and other patents and pending patents.

11679-E 01
 Effective: 2007-02-23