

ENGLISH

Anti-AtherOx™ IgM Test Kit IgM anti-oxLDL-β₂GPI Antibody

For In Vitro Diagnostic Use

INTENDED USE

An enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the determination of IgM antibodies to complexes formed by the interaction of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) with β₂-glycoprotein I (β₂GPI) in human serum. The measurement of IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibodies may be used as an aid in the serologic risk assessment of arterial thrombosis and atherothrombotic cardiovascular disease in individuals with systemic autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), and lupus-like disorders such as the antiphospholipid syndrome (APS).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY

Atherosclerosis is characterized by a gradual thickening of arterial walls due to the excessive accumulation of lipids, a process that leads to reduced elasticity, decreased blood supply, thrombus (clot) formation and tissue or organ damage. Experimental evidence indicates that pro-inflammatory factors and dyslipidemia are the main contributors to the development of atherosclerosis.¹⁻⁵ Low-density lipoprotein (LDL) is the principal form of cholesterol that accumulates in atherosclerotic lesions or plaques, but LDL must be first modified into an oxidized structure (oxLDL). The most significant pro-atherogenic mechanism for modifying LDL into oxLDL is oxidative stress.^{6,7} In addition, chronic oxidative stress produces endothelium and platelet dysfunction, which in combination with the accumulation of oxLDL in the arterial wall, leads to the development of an arterial pro-thrombotic state referred to as athero-thrombosis.⁸⁻¹³

Unlike native LDL, oxLDL binds to β₂GPI to form oxLDL-β₂GPI complexes.¹⁴⁻¹⁷ Both oxLDL and β₂GPI have been demonstrated in atherosclerotic lesions by immunostaining, along with immunoreactive lymphocytes and immunoglobulins. OxLDL-β₂GPI complexes are immunogenic and antibodies to this complex have been demonstrated in patients with SLE and APS.^{6,18} The *in vitro* macrophage uptake of oxLDL-β₂GPI complexes is mediated by scavenger receptors, and this uptake is significantly enhanced in the presence of anti-β₂GPI antibodies, a process likely mediated by Fcγ receptors.¹⁷ This mechanism is physiologically relevant to explain the accelerated development of foam cells within the atherosclerotic lesions or plaques. Thus, autoantibodies to pro-atherogenic oxLDL-β₂GPI complexes may represent a serologic risk factor and/or a significant contributor to the development of autoimmune-mediated athero-thrombosis.¹⁹⁻²¹

The premature (or accelerated) development of clinical atherosclerosis in patients with systemic autoimmune diseases cannot be fully explained by the traditional risk factors or disease treatment i.e. steroids.²²⁻²⁵ Elevated serum levels of oxLDL-β₂GPI complexes and anti-oxLDL-β₂GPI antibodies have been demonstrated in patients with SLE and APS, disorders characterized by a pro-thrombotic predisposition and significant vascular complications.²⁶⁻²⁸ Anti-oxLDL-β₂GPI antibodies were strongly associated with arterial thrombosis. These antibodies also showed a positive predictive value for APS and arterial thrombosis of 90%, compared to 77% for venous thrombosis, while the predictive value of anti-cardiolipin (aCL) antibodies was 71% for APS and 64% for arterial thrombosis.²⁹ Thus, the presence of circulating autoantibodies to oxLDL-β₂GPI complexes are etiologically important in the development of autoimmune-mediated athero-thrombotic complications.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum samples, calibrator(s), and controls are incubated in microwells coated with the oxLDL- β_2 GPI complex. Incubation allows the IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody present in the samples to react with the immobilized antigen complex. After the removal of unbound serum proteins by washing, anti-human IgM antibodies, labeled with horseradish peroxidase (HRP), are added forming complexes with the bound IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of a solution containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the serum concentration of IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody.

Results are obtained by reading the OD (optical density or absorbance) of each well in a spectrophotometer. Calibrator sera are provided, with the IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody concentration expressed in M Units. The user has the option of running either a single point calibrator or a three-point calibration curve. For single point calibration, dividing the concentration value of the calibrator serum by the OD value of the calibrator provides a conversion factor. The OD values of the other samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody concentrations in M Units. For multipoint calibration, perform a log-log regression analysis with calibrator values against calibrator mean ODs. Controls and patient results are determined from the calibration curve.

REAGENTS

Store at 2–8°C. Do Not Freeze.

Each Anti-AtherOx™ IgM Test Kit contains the following reagents:
(volumes may vary depending on kit size and configuration):

- 12x8 stabilized oxLDL- β_2 GPI antigen (human) coated microwells, with frame.
- 2 bottles (60 mL) Sample Diluent* (green solution).
- 3 vials (0.250 mL) IgM Calibrator Sera* (human) (1-high, 2-moderate, 3-low) - refer to vial label for the assigned value in M Units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 1 vial (0.250 mL) IgM Positive Control Serum* (human) - refer to vial label for expected range in M Units.
- 1 vial (0.250 mL) IgM Normal Control Serum* (human) - refer to vial label for expected range in M Units.
- 1 bottle (15 mL) IgM anti-human (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution).
- 1 bottle (15 mL) One-Component Substrate (TMB and H_2O_2); 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 material used to prepare the calibrators and controls included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV, HIV I & 2, and Syphilis 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 26-36). Do not empty into drains (S 29). 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-AtherOx™ IgM Test Kit; see “Reagents,” for a complete listing.

Materials Required but not Provided:

- Reagent grade water to prepare PBS/Tween 20 wash solution (1L)
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 10 µL and 1000 µL, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware 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 to 8 wells simultaneously

Procedural Notes

1. Bring serum samples and kit reagents to room 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 calibrators, controls, and test sera must be made just prior to use in the assay.
3. The plate reader should be programmed to blank or zero against air.
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. 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 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Careful 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 (18–26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
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 PBS/Tween 20 solution in the refrigerator at 2–8°C . Discard if the solution shows signs of microbial or contamination.

Assay Procedure

1. The assay can be performed with a single point calibration (Calibrator 2) or a three-point calibration curve (Calibrators 1, 2, and 3). A reagent blank control must be run with each assay; Sample Diluent without serum is added to the 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 1:100 dilution of the calibrator(s), controls and patient samples in Sample Diluent (green solution); e.g., 10 μ L sample added to 1000 μ L Sample Diluent equals a 1:100 sample dilution.
4. Add 100 μ L of prepared calibrator(s), diluted controls, diluted patient samples, and reagent blank sample to the appropriate microwells.
5. Incubate 60 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
6. Wash 4 times with wash solution. Each well should be filled with solution per wash. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
7. Add 100 μ L IgM anti-human HRP-conjugated antibody solution (red) to the wells corresponding to the IgM calibrator(s), controls, patient samples, and reagent blank.
8. Incubate for 60 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solution.
9. Wash 4 times with wash solution as in step 6. Use a snapping motion to drain the liquid and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
10. Add 100 μ L One-Component Substrate to each well and incubate for 30 minutes at room temperature. 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 Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue substrate will turn yellow and colorless substrate will remain colorless. Blank or zero the plate reader against air. Read the OD of each well at 450 nm (650 nm reference, if available). The OD values should be measured within 5 minutes after the addition of Stopping Solution.

Results

Single Point Calibration

1. Calculate the mean OD values if duplicate wells of Calibrator 2, controls, and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on the vial label) by the OD (or mean OD) value of the calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the OD (or mean OD) value for each of the controls and patient samples by the conversion factor to obtain a value in M Units.

$$\text{Conversion Factor} = \frac{\text{Assigned Value of Calibrator 2}}{\text{Absorbance Value of the Calibrator 2 (OD)}}$$

$$\text{Value of sample} = \text{Conversion Factor} \times \text{Absorbance of the sample (OD)}$$

4. Using a conversion factor from another assay will invalidate the results.
5. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control section) before reporting test results.

Multi-Point Curve Calibration

1. Calculate the mean OD values if duplicate wells of the calibrators, controls, and patient samples were performed.
2. Perform a log-log regression analysis with the three calibrator values (see vial labels for M Units) against the ODs for each calibrator.
3. The calibrator curve can be plotted either automatically using a validated software program or manually with graph paper. When generating the curve manually, draw a best-fit line through the plotted points on log-log graph paper.
4. Determine the control and patient sample values from the calibrator curve.
5. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control section) before reporting test results.

QUALITY CONTROL

1. The OD value or mean OD value of Calibrator 2 should be at least 0.400 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator 2 OD readings of less than 0.400 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
2. The OD value or mean OD value of the reagent blank should be less than 0.100 when the spectrophotometer has been properly blanked against air. Readings greater than 0.100 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The IgM anti-OxLDL- β_2 GPI antibody values obtained for the control sera should be within the ranges indicated on the container labels. Occasional small deviations outside these ranges are acceptable.
4. OD values for the duplicates (if performed) of the controls or patient samples should be within 20% of the mean OD value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
5. Each laboratory should periodically determine their own normal range for the appropriate population of patients.
6. Samples with values greater than 100 Units may be reported as “greater than 100 M Units”. Alternatively, the sample may be additionally diluted 1:10 and re-run in the assay. The resulting value in M Units would then be multiplied by a factor of 10.

NORMAL RANGE

Serum samples from 100 healthy blood donors were tested across 4 lots of the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit. The mean IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody value of this population was determined to be 11 M Units, with a standard deviation of 6.4 Units. The 95th percentile was 24.3 M Units and the mean + 2SD was 23.7 M Units. A normal range of 0–20 M Units was established based on both calculations from the normal population.

IgM ANTI-oxLDL- β_2 GPI ANTIBODY NORMAL RANGE = 0–20 M UNITS

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical specificity

Serum samples from 133 healthy individuals were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical specificity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody value of this population was determined to be 8 M Units, with a standard deviation of 5.6 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 8 serum samples were found to be positive, resulting in an overall clinical specificity of 94%.

Clinical sensitivity

Autoimmune patients

Serum samples from 92 unselected SLE patients were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical sensitivity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody value of this population was determined to be 6.8 M Units, with a standard deviation of 7.7 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 5 serum samples were found to be positive, resulting in an overall clinical sensitivity of 5%.

Serum samples from 30 selected SLE patients with cardiovascular disease (CVD) were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical sensitivity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL- β_2 GPI antibody value of this population was determined to be 9.5 M Units, with a standard deviation of 11.4 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 2 serum samples were found to be positive, resulting

in an overall clinical sensitivity of 7%. Serum samples from 31 selected patients with CVD without SLE (controls) showed a mean value of 4 M Units with a standard deviation of 3.3 Units and a sensitivity of 0%. A group of 27 healthy controls showed a mean value of 6.2 M Units with a standard deviation of 4 Units and a sensitivity of 0%.

Serum samples from 11 secondary APS patients were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical sensitivity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibody value of this population was determined to be 13.8 M Units, with a standard deviation of 12 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 3 serum samples were found to be positive, resulting in an overall clinical sensitivity of 27%. Serum samples from 31 SLE without APS (controls) showed a mean value of 5.4 M Units with a standard deviation of 4.4 Units and a sensitivity of 0%.

Serum samples from 54 APS patients were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical sensitivity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibody value of this population was determined to be 13.2 M Units, with a standard deviation of 15.5 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 11 serum samples were found to be positive, resulting in an overall clinical sensitivity of 20.4%.

Serum samples from 80 unselected RA patients were tested on the Anti-AtherOx™ IgM Test Kit to determine the clinical sensitivity of the assay. The mean IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibody value of this population was determined to be 19 M Units, with a standard deviation of 15.8 Units. Relative to the established normal range of 0–20 M Units, 32 serum samples were found to be positive, resulting in an overall clinical sensitivity of 40%. IgM anti-AtherOx™ antibody values did not correlate with IgM RF titers in the RA population (R=0.178).

Precision:

The Anti-AtherOx™ IgM Test Kit was evaluated for intra-assay (16 replicates per assay) and inter-assay (3 assays, 16 replicates per assay) value precision across 4 kit lots. The mean coefficients of variation (CV%) obtained are summarized in the following table:

Mean IgM anti-oxLDL-β ₂ GPI antibody value of sample	Intra-assay mean CV%	Inter-assay mean CV%
56.5 Units	3.8%	2.1%
41.9 Units	4.5%	2.6%
4.8 Units	6.0%	3.5%

LIMITATIONS OF THE TEST

IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibody levels obtained with this assay may be used to assess the risk for the development of atherothrombotic disease in patients with systemic autoimmune disorders and APS. Each physician must interpret these results in light of the patient’s history, physical findings and other diagnostic procedures.

IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibodies may be produced when oxidative stress caused by various underlying inflammatory conditions form oxLDL-β₂GPI complexes. However, other transient conditions such as certain bacterial infections may cause oxidative stress, formation of oxLDL-β₂GPI complexes, and IgM antibodies to these complexes. The exact clinical significance of these IgM anti-oxLDL-β₂GPI antibodies is under further investigation.

The presence of Rheumatoid Factor (RF) in patients’ samples can sometimes interfere with ELISA methods by binding to antibodies. The presence of RF should be considered when evaluating results.

Testing patients’ samples containing excess hemoglobin, lipids, and/or bilirubin is not recommended as these substances may interfere with the results of the assay.

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, 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-AtherOx™ IgM Test Kit IgM anti-oxLDL-β₂GPI Antibody

In-vitro-Diagnostikum

ANWENDUNGSGEBIET

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) für die Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Komplexe, die sich durch Wechselwirkung zwischen oxidiertem Lipoprotein niedriger Dichte (oxLDL) und β₂-Glycoprotein-I (β₂GPI) in Humanserum bilden. Die Bestimmung der IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper kann bei der serologischen Risikobewertung für arterielle Thrombose und atherothrombotische Herz-Kreislaufkrankung bei Personen mit systemischen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis (RA), systemischem Lupus erythematosus (SLE) und lupusähnlichen Erkrankungen wie Antiphospholipid-Syndrom (APS) als Hilfsmittel herangezogen werden.

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. In mit dem oxLDL-β₂GPI-Komplex beschichteten Mikrovertiefungen werden verdünnte Serumproben, Kalibrator(en) und Kontrollen inkubiert. Durch die Inkubation kann der in den Proben vorhandene IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper mit dem immobilisierten Antigenkomplex reagieren. Nach Entfernung der ungebundenen Serumproteine durch Auswaschen werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte Antihuman-IgM-Antikörper zugegeben, die mit dem gebundenen IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper Komplexe bilden. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als chromogenes Substrat enthält, bestimmt. Die Farbe entsteht in den Vertiefungen, wobei die Intensität proportional zur IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper-Serumkonzentration ist.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bzw. Extinktion in allen Vertiefungen mit einem Spektrophotometer. Es werden Kalibrationsseren mitgeliefert, deren IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper-Konzentrationen in M-Einheiten angegeben sind. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Dreipunkt-Kalibrationskurve verwenden. Bei der Einpunktkalibration wird zur Berechnung des Umrechnungsfaktors die Konzentration des Kalibratorserums durch den OD-Wert des Kalibrators dividiert. Die OD-Werte der anderen Proben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper in M-Einheiten zu erhalten. Zur Mehrpunktkalibration wird eine logarithmische Regressionsanalyse mit Kalibratorwerten gegen die mittleren Kalibrator-OD-Werte durchgeführt. Die Ergebnisse für Kontrollen und Patientenproben werden mit Hilfe der Kalibrationskurve bestimmt.

REAGENZILIEN

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder Anti-AtherOx™-IgM-Testkit enthält die folgenden Reagenzien:

(Volumen können je nach Größe und Konfiguration des Kits variieren):

- 12x8 mit stabilisiertem oxLDL-β₂GPI-Antigen (human) beschichtete Mikrovertiefungen mit Halterung.
- 2 Flaschen (60 ml) Probenverdünner* (grüne Lösung).
- 3 Fläschchen (0,250 ml) IgM-Kalibratorserum* (human) (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); der Sollwert in M-Einheiten ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden.
- 1 Fläschchen (0,250 ml) IgM-Kontrollserum, positiv* (human); Erwartungsbereich in M-Einheiten: siehe Fläschchenetikett.
- 1 Fläschchen (0,250 ml) IgM-Normalkontrollserum* (human); der zu erwartende Bereich ist in M-Einheiten auf dem Fläschchenetikett angegeben.
- 1 Flasche (15 ml) IgM-Antihuman-Antikörperlösung (Ziege), HRP-konjugiert (rote Lösung).

- 1 Flasche (15 ml) Einkomponentensubstrat (TMB und H₂O₂) gebrauchsfertig.
- 1 Flasche (15 ml) Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure).
- 2 Flaschen (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 für 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. Die Einkomponentensubstratlösung 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 26-36). Nicht in die Kanalisation gelangen lassen (S 29). Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S 36).

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Serum ist die bevorzugte Probenmatrix. Nach der Probengewinnung durch Venenpunktion sollte das Serum von den Zellen durch Zentrifugierung getrennt werden, sobald das Blut geronnen ist. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind 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 darf nicht verwendet werden, da dies die Ergebnisse verfälschen kann. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, sollten vor dem Test durch Zentrifugierung geklärt werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

Anti-AtherOx™ IgM-Testkit; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

Zusätzlich benötigte 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 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 beschickt werden können

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. Das Plattenlesegerät ist so zu programmieren, dass es gegen Luft Null anzeigt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritze auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. 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 8 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 fünf 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 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.
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 abmessen (33X PBS/Tween 20) und mit analysereinem Wasser auf 1 Liter verdünnen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete PBS/Tween 20-Lösung im Kühlschrank bei 2–8 °C aufbewahren. Bei Anzeichen einer mikrobiellen oder Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Der Test kann mit Hilfe einer Einpunktkalibration (Kalibrator 2) oder einer Dreipunktkalibrationskurve (Kalibratoren 1, 2 und 3) durchgeführt werden. Für jeden Testlauf muss eine Reagenzblindkontrolle durchgeführt werden. In diese Vertiefung wird Probenverdünner ohne Serum pipettiert. 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 1:100 Verdünnung von Kalibrator(en), Kontrollen und Patientenproben im Probenverdünner (grüne Lösung) herstellen; z.B. entspricht 10 µl Probe zu 1000 µl Probenverdünner hinzugegeben einer Probenverdünnung von 1:100.
4. 100 µl der vorbereiteten Kalibratoren, verdünnten Kontrollen, verdünnten Patientenproben und der Reagenzblindprobe in die entsprechenden Mikrovertiefungen geben.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach abgeschlossener Inkubation die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umkehren der Mikrovertiefungen entleeren. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
6. Viermal mit Waschlösung waschen. Jede Vertiefung muss bei jedem Waschvorgang mit Lösung gefüllt werden. Nach jedem Waschschritt wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Die Halterung muss in der Mitte, oben und unten zusammengedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrovertiefungen beim Waschen zu vermeiden. Auf saugfähigem Papier abtupfen, um die Waschlösung restlos zu entfernen. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Waschsritten nicht austrocknen.

7. 100 µl HRP-konjugierte IgM-Antihuman-Antikörperlösung (rot) in die zugehörigen Vertiefungen für IgM-Kalibrator(en), Kontrollen, Patientenproben und Blindkontrolle geben.
8. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach abgeschlossener Inkubation die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umkehren der Mikrovertiefungen entleeren.
9. Viermal wie in Schritt 6 mit Waschlösung waschen. Nach dem letzten Waschvorgang die Flüssigkeit durch eine schnelle Bewegung abfließen lassen und auf saugfähigem Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
10. In jede Vertiefung 100 µl Einkomponentensubstrat geben und 30 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. 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Die blaue Substratlösung schlägt nach gelb um, während bisher farblos gebliebene Lösungen weiterhin farblos bleiben. Das Plattenlesegerät gegen Luft auf Null setzen. Die OD-Werte jeder Vertiefung bei 450 nm (Referenz von 650 nm, falls vorhanden) ablesen. Die OD-Werte sollten innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmt werden.

Ergebnisse

Einpunktkalibration

1. Die OD-Werte berechnen, wenn Kalibrator 2, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen (je 2 Vertiefungen) analysiert wurden.
2. Die Konzentration des Kalibrators 2 (auf dem Fläschchenetikett aufgedruckt) durch den OD-Wert oder den OD-Mittelwert des Kalibratorserums dividieren, um den Umrechnungsfaktor zu erhalten.
3. Den OD-Wert oder den OD-Mittelwert für jede Kontrolle und Patientenprobe mit dem Umrechnungsfaktor multiplizieren, um einen Wert in M-Einheiten zu erhalten.

$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{Sollwert von Kalibrator 2}}{\text{Extinktionswert von Kalibrator 2 (OD)}}$
$\text{Probe} = \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{Extinktion der Probe (OD)}$

4. Verwendung eines Umrechnungsfaktors aus einem anderen Test führt zu ungültigen Ergebnissen.
5. Bevor die Analysenergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Abschnitt Qualitätskontrolle).

Kalibration über Mehrpunktkurve

1. Die OD-Werte berechnen, wenn Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen (je zwei Vertiefungen) analysiert wurden.
2. Mit den drei Kalibratorwerten (die M-Einheiten sind auf den Fläschchenetiketten angegeben) eine logarithmische Regressionsanalyse gegen die OD-Werte der jeweiligen Kalibratoren durchführen.
3. Die Kalibratorkurve kann entweder automatisch mit Hilfe eines validierten Softwareprogramms oder manuell auf Millimeterpapier erstellt werden. Wenn die Kurve manuell erstellt wird, eine angepasste Linie durch die eingezeichneten Punkte auf dem logarithmischen Grafikpapier zeichnen.
4. Mit Hilfe der Kalibrationskurve die Werte für Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
5. Bevor die Analysenergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Abschnitt Qualitätskontrolle).

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Der OD-Wert oder OD-Mittelwert von Kalibrator 2 muss mindestens 0,400 betragen, damit die ordnungsgemäße Funktion des Kits sichergestellt ist. Wenn Kalibrator 2 einen OD-Wert von weniger als 0,400 aufweist, kann dies darauf hinweisen, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Der OD-Wert oder OD-Mittelwert der Reagenzblindkontrolle sollte weniger als 0,100 betragen, wenn das Spektralphotometer ordnungsgemäß gegen Luft auf Null gestellt wurde. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollserien erhaltenen IgM-Anti-oxLDL- β_2 GPI-Antikörperwerte müssen in die auf den Behälteretiketten angegebenen Bereiche fallen. Gelegentliche geringe Abweichungen von diesem Bereich sind gestattet.
4. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen, sofern durchgeführt, von Kontrollen oder Patientenproben um nicht mehr als 20% vom OD-Mittelwert abweichen.
5. Jedes Labor sollte regelmäßig seine eigenen Normalbereiche für die jeweilige Patientenpopulation festlegen.
6. Proben mit Werten von über 100 Einheiten können als „über 100 M-Einheiten“ angegeben werden. Alternativ kann die Probe zusätzlich im Verhältnis 1:10 verdünnt und erneut getestet werden. Der erhaltene Wert in M-Einheiten muss dann mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

NORMALBEREICH

Serumproben von 100 gesunden Blutspendern wurden mit 4 Chargen des Anti-AtherOx™-IgM-Testkits getestet. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL- β_2 GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 11 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 6,4 Einheiten. Das 95. Perzentil betrug 24,3 M-Einheiten, der Mittelwert + 2 SD war 23,7 M-Einheiten. Auf Basis dieser Normalpopulationswerte wurde ein Normalbereich von 0–20 M-Einheiten ermittelt.

IgM-ANTI-oxLDL- β_2 GPI-ANTIKÖRPER-NORMALBEREICH = 0–20 M-EINHEITEN

TESTCHARAKTERISTIKA

Klinische Spezifität

Zur Bestimmung der klinischen Spezifität des Tests wurden Serumproben von 133 gesunden Personen mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL- β_2 GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 8 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 5,6 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 8 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Spezifität von 94%.

Klinische Empfindlichkeit

Patienten mit Autoimmunerkrankungen

Zur Bestimmung der klinischen Empfindlichkeit des Tests wurden Serumproben von 92 nicht-selektierten SLE-Patienten mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL- β_2 GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 6,8 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 7,7 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 5 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Empfindlichkeit von 5%.

Zur Bestimmung der klinischen Empfindlichkeit des Tests wurden Serumproben von 30 selektierten SLE-Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung (CVD) mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL- β_2 GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 9,5 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 11,4 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 2 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Empfindlichkeit von 7%. Der Mittelwert von Serumproben von 31 selektierten Patienten mit CVD ohne SLE (Kontrollen) lag bei 4 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 3,3 Einheiten und einer Empfindlichkeit von 0%. Bei einer Gruppe von 27 gesunden Kontrollpersonen lag der Mittelwert bei 6,2 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 4 Einheiten und einer Empfindlichkeit von 0%.

Zur Bestimmung der klinischen Empfindlichkeit des Tests wurden Serumproben von 11 sekundären APS-Patienten mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 13,8 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 12 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 3 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Empfindlichkeit von 27%. Serumproben von 31 SLE-Patienten ohne APS (Kontrollen) zeigten einen Mittelwert von 5,4 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 4,4 Einheiten und einer Empfindlichkeit von 0%.

Zur Bestimmung der klinischen Empfindlichkeit des Tests wurden Serumproben von 54 APS-Patienten mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 13.2 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 15.5 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 11 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Empfindlichkeit von 20.4%.

Zur Bestimmung der klinischen Empfindlichkeit des Tests wurden Serumproben von 80 nicht-selektierten RA-Patienten mit dem Anti-AtherOx™-IgM-Testkit analysiert. Der mittlere IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörperwert für diese Population betrug 19 M-Einheiten mit einer Standardabweichung von 15,8 Einheiten. Unter Zugrundelegung des zuvor ermittelten Normalbereichs von 0–20 M-Einheiten zeigten 32 Serumproben ein positives Ergebnis; daraus ergibt sich insgesamt eine klinische Empfindlichkeit von 40%. Bei der RA-Population ergab sich keine Korrelation zwischen den IgM-Anti-AtherOx™-Antikörperwerten und den IgM-RF-Titern (R=0,178).

Präzision

Für den Anti-AtherOx™-IgM-Testkit wurden die Intra-Test-Präzision (16 Replikate pro Test) und die Inter-Test-Präzision (3 Tests, 16 Replikate pro Test) unter Verwendung von 4 Kitchargen bestimmt. Die mittleren Variationskoeffizienten (CV%) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Mittlerer IgM-Anti-oxLDL-β ₂ GPI-Antikörperwert der Probe	Mittlerer Intra-Test-CV%	Mittlerer Inter-Test-CV%
56,5 Einheiten	3,8%	2,1%
41,9 Einheiten	4,5%	2,6%
4,8 Einheiten	6,0%	3,5%

GRENZEN DES TESTS

Mit diesem Test erhaltene IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörperwerte können zur Bewertung des Risikos der Entwicklung atherothrombotischer Erkrankungen bei Patienten mit systemischen Automimmunerkrankungen und APS herangezogen werden. Jeder Arzt muss diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten, der körperlichen Untersuchung sowie den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretieren.

IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper können infolge von oxidativem Stress gebildet werden, wenn sich durch verschiedene zugrundeliegende entzündliche Vorgänge oxLDL-β₂GPI-Komplexe bilden. Auch andere vorübergehende Erkrankungen, wie z.B. bestimmte bakterielle Infektionen, können zu oxidativem Stress mit Bildung von oxLDL-β₂GPI-Komplexen und IgM-Antikörpern gegen diese Komplexe führen. Die genaue klinische Signifikanz dieser IgM-Anti-oxLDL-β₂GPI-Antikörper wird noch untersucht.

In Patientenproben vorhandener Rheumafaktor (RF) kann durch Bindung an Antikörper einen ELISA-Test gelegentlich stören. Bei der Ergebnisbewertung sollte eine mögliche Beeinflussung durch RF in Betracht gezogen werden.

Patientenproben mit sehr hohen Spiegeln an Hämoglobin, Lipiden und/oder Bilirubin werden für den Test nicht empfohlen, da diese Substanzen den Test stören können.

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 oder allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den Vereinigten Staaten unter 1-800-729-5661; außerhalb der USA unter +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-AtherOx™ IgM Test Kit IgM anti-oxLDL-β₂GPI Antibody

Pour utilisation diagnostique in vitro

UTILISATION ENVISAGÉE

Un dosage immunoenzymatique (ELISA) pour la détermination des anticorps IgM contre les complexes formés par l'interaction entre la lipoprotéine de faible densité oxydée (oxLDL) et la β₂ glycoprotéine I (β₂GPI) dans du sérum humain. La mesure des anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI peut être utilisée en tant qu'aide à l'évaluation sérologique des risques de thrombose artérielle et de maladie athérotrombotique coronaire chez des personnes atteintes de maladie autoimmunes systémiques telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus érythémateux systémique (LES) et les troubles lupiques tel que le syndrome des antiphospholipides, (SAPL).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Les échantillons sériques, les sérums étalon et les contrôles dilués sont incubés dans des micropuits enduits du complexe oxLDL-β₂GPI. L'incubation permet aux anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI présents dans les échantillons de réagir avec le complexe antigène immobilisé. Après élimination par lavage des protéines sériques non liées, des anticorps IgM anti-humains marqués à la peroxydase de raifort (PR) sont ajoutés pour former des complexes avec l'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI lié. Après un deuxième lavage, le conjugué enzyme-anticorps lié est dosé par ajout d'une solution contenant de la tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à titre de substrat chromogène. La coloration se développe dans les puits à une intensité proportionnelle à la concentration sérique d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI.

Les résultats s'obtiennent par lecture de la D.O. (densité optique ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Des sérums étalon sont fournis, dont la concentration en anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI est exprimée en unités M. L'utilisateur peut choisir d'utiliser un étalonnage à point unique ou une courbe d'étalonnage à trois points. Dans le cas d'un étalonnage à point unique, la division de la valeur de concentration d'un sérum étalon par la valeur de D.O. de cet étalon donne un facteur de conversion. Les valeurs de D.O. des autres échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI en unités M. Dans le cas d'un étalonnage multipoint, effectuer une analyse par régression linéaire avec les valeurs log-log de sérum étalon comparées aux D.O. moyennes. Les résultats des contrôles et des échantillons patients sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage.

RÉACTIFS

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

Chaque kit de tests Anti-AtherOx™ IgM contient les réactifs suivants :

(les volumes peuvent varier en fonction de la taille et de la configuration du kit) :

- Barrette de 12 x 8 micropuits enduits d'antigène oxLDL-β₂GPI (d'origine humaine) stabilisé, avec cadre.
- 2 bouteilles (60 ml) de tampon pour échantillon* (solution verte).
- 3 flacons (0,250 ml) de sérum étalon d'IgM* (d'origine humaine) (1 - à concentration élevée, 2 - à concentration modérée, 3 - à concentration faible) ; consulter l'étiquette du flacon pour la valeur assignée en unités M. Utiliser le sérum étalon 2 pour un étalonnage à point unique.
- 1 flacon (0,250 ml) de sérum positif de contrôle d'IgM* (d'origine humaine) ; consulter l'étiquette du flacon pour la plage attendue en unités M.
- 1 flacon (0,250 ml) de sérum normal de contrôle d'IgM* (d'origine humaine) ; consulter l'étiquette du flacon pour la plage attendue en unités M.

- 1 bouteille (15 ml) de solution de conjugué anticorps anti-IgM humaine (d'origine caprine)-PR (solution rouge).
- 1 bouteille (15 ml) de substrat à un composant (TMB et H₂O₂); 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 (33 x SPTP/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 les sérums étalon et les contrôles inclus dans ce kit ont été testés et ont produit des résultats négatifs pour les anticorps anti-HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1 et 2 et anti-syphilis 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. 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 26-36). Ne pas jeter les résidus à l'égoût (S 29). 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 °C et 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:

Kit de tests Anti-AtherOx™ IgM ; voir la section « Réactifs » pour une liste complète.

Matériel nécessaire mais non fourni :

- Eau pure pour analyse (1 l) pour préparer la solution mère SPTP/Tween 20
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de distribuer entre 10 µl et 1 000 µl, avec embouts appropriés
- Verrerie 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 dans 8 puits simultanément

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons sériques et les réactifs à température ambiante (18 °C à 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 extemporanément.
3. Le lecteur de plaque doit être réglé à zéro sur l'air.
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. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de microplaque.
5. IMPORTANT : L'élimination imparfaite des résidus SPTP/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 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. Il est impératif d'ajouter en moins de cinq minutes tous les étalons, contrôles et échantillons. 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 (18 °C à 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.
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 (SPTP/Tween 20) : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (33 x SPTP/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 SPTP/Tween 20 inutilisée au réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.

Procédure de dosage

1. Ce dosage peut être effectué avec un étalonnage à point unique (sérum étalon 2) ou une courbe d'étalonnage à trois points (sérum étalon 1, 2 et 3). Un réactif à blanc de contrôle doit être traité pour chaque dosage. Du tampon pour échantillon sans sérum est ajouté au puits. 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. Préparer une dilution 1/100 des sérums étalon, des contrôles et des échantillons patients dans du tampon pour échantillon (solution verte) ; par exemple, l'ajout de 10 µl d'échantillon à 1 000 µl de tampon pour échantillon équivaut à une dilution 1/100 de l'échantillon.
4. Ajouter 100 µl de chaque dilution de sérum étalon, de contrôle, d'échantillon patient et du réactif à blanc préparés aux micropuits appropriés.
5. Laisser incuber 60 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner les micropuits avec précaution et jeter le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
6. Laver 4 fois à l'aide de solution mère. Chaque puits doit être rempli de solution à chaque étape de lavage. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Faire pression sur le centre de la partie supérieure et de la partie inférieure du cadre afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer les résidus de liquide de lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
7. Ajouter 100 µl de conjugué anticorps anti-IgM humaine-PR (solution rouge) aux puits de sérum étalon IgM, des contrôles, des échantillons patients et du réactif à blanc.

8. Laisser incuber 60 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner les micropuits avec précaution et jeter le liquide des échantillons.
9. Laver 4 fois avec la solution mère ainsi qu'il est décrit à l'étape 6. Après le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et éponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
10. Ajouter 100 µl de substrat à un composant dans chaque puits et laisser incuber 30 minutes à température ambiante. Ajouter la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une coloration 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. La solution substrat bleue devient jaune et la solution substrat incolore reste incolore. Régler le lecteur de plaque à zéro sur l'air. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm (et à la référence 650 nm si disponible). 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 les D.O. moyennes si le sérum étalon 2, les contrôles et les échantillons patients ont été traités en double.
2. Diviser la valeur de concentration du sérum étalon 2 (imprimée sur l'étiquette du flacon) par sa D.O. (ou sa D.O. moyenne) pour obtenir le facteur de conversion.
3. Multiplier la D.O. (ou la D.O. moyenne) de chacun des contrôles et échantillons patients par le facteur de conversion pour obtenir une valeur en unités M.

$$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Valeur assignée du sérum étalon 2}}{\text{Valeur d'absorbance du sérum étalon 2 (D.O.)}}$$

$$\text{Valeur de l'échantillon} = \text{Facteur de conversion} \times \text{Absorbance de l'échantillon (D.O.)}$$

4. L'utilisation d'un facteur de conversion d'un autre dosage produira des résultats non valides.
5. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

Étalonnage par courbe multipoint

1. Calculer les D.O. moyennes si les sérums étalon, les contrôles et les échantillons patients ont été traités en double.
2. Effectuer l'analyse par régression linéaire avec les valeurs log-log des trois sérums étalon (se référer aux unités M des étiquettes des flacons) comparées à la D.O. de chaque sérum étalon.
3. La courbe d'étalonnage peut être tracée automatiquement à l'aide d'un logiciel validé ou manuellement sur du papier graphique. Pour établir la courbe manuelle, tracer la ligne optimale passant par les points tracés sur du papier log-log.
4. Déterminer les valeurs des contrôles et des échantillons patients à partir de la courbe d'étalonnage.
5. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La valeur de D.O. ou valeur de D.O. moyenne du sérum étalon 2 doit être d'au moins 0,400 pour valider le bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,400 peut indiquer que le kit est périmé.
2. La valeur de D.O. ou valeur de D.O. moyenne du réactif à blanc doit être inférieure à 0,100 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été correctement réglé sur l'air. 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 des anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI obtenues pour les sérums de contrôle doivent se situer dans les plages indiquées sur les étiquettes des conteneurs. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Les valeurs de D.O. pour les doubles des contrôles ou des échantillons patients ne doivent pas différer de plus de 20 % de la valeur moyenne des échantillons dont les résultats de densité optique sont supérieurs à 0,200.

5. Chaque laboratoire doit confirmer régulièrement ses plages normales pour la population de patients appropriée.
6. Les échantillons dont les valeurs sont supérieures à 100 unités peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 100 unités M ». Une autre solution consiste à effectuer une dilution 1/10 supplémentaire de l'échantillon et de répéter le dosage. La valeur résultante en unités M doit alors être multipliée par 10.

PLAGE NORMALE

100 échantillons sériques provenant de donneurs de sang sains ont été testés avec 4 lots du kit de tests Anti-AtherOx™ IgM. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 11 unités M, avec un écart-type de 6,4 unités. Le 95^e centile était de 24,3 unités M et la moyenne + 2 écarts-types était de 23,7 unités M. Une plage normale de 0 à 20 unités M a été établie basée sur les deux calculs effectués sur la population normale.

PLAGE NORMALE DE L'ANTICORPS IgM ANTI-oxLDL-Aβ₂GPI = 0 A 20 UNITES M

PERFORMANCE - CARACTÉRISTIQUES

Spécificité clinique

133 échantillons sériques provenant de sujets sains ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la spécificité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 8 unités M, avec un écart-type de 5,6 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 8 échantillons sériques étaient positifs, produisant une spécificité clinique globale de 94 %.

Sensibilité clinique

Patients atteints de maladies auto-immunes

92 échantillons sériques provenant de patients non sélectionnés atteints de LES ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la sensibilité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 6,8 unités M, avec un écart-type de 7,7 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 5 échantillons sériques étaient positifs, produisant une sensibilité clinique globale de 5 %.

30 échantillons sériques provenant de patients sélectionnés atteints de LES et présentant une maladie cardiovasculaire ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la sensibilité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 9,5 unités M, avec un écart-type de 11,4 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 2 échantillons sériques étaient positifs, produisant une sensibilité clinique globale de 7 %. 31 échantillons sériques provenant de patients sélectionnés présentant une maladie cardiovasculaire sans LES (contrôles) ont démontré une valeur moyenne de 4 unités M avec un écart-type de 3,3 unités et une sensibilité de 0 %. Un groupe de 27 contrôles sains a démontré une valeur moyenne de 6,2 unités M avec un écart-type de 4 unités et une sensibilité de 0 %.

11 échantillons sériques provenant de patients atteints d'un SAPL secondaire ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la sensibilité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 13,8 unités M, avec un écart-type de 12 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 3 échantillons sériques étaient positifs, produisant une sensibilité clinique globale de 27 %. 31 échantillons sériques provenant de patients atteints de LES sans SAPL (contrôles) ont démontré une valeur moyenne de 5,4 unités M avec un écart-type de 4,4 unités et une sensibilité de 0 %.

54 échantillons sériques provenant de patients atteints d'un SAPL ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la sensibilité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 13,2 unités M, avec un écart-type de 15,5 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 11 échantillons sériques étaient positifs, produisant une sensibilité clinique globale de 20,4 %.

80 échantillons sériques provenant de patients non sélectionnés atteints de polyarthrite rhumatoïde ont été testés avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM pour déterminer la sensibilité clinique du dosage. Il a été déterminé que pour cette population, la valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI moyenne était de 19 unités M, avec un écart-type de 15,8 unités. Par rapport à la plage normale établie de 0 à 20 unités M, 32 échantillons sériques étaient positifs, produisant une sensibilité clinique globale de 40 %. Les valeurs d'anticorps IgM anti-AtherOx™ ne corrélaient pas avec les titrages FR d'IgM dans la population atteinte de PR (R = 0,178).

Précision

La précision des valeurs obtenues avec le kit de tests Anti-AtherOx™ IgM a été évaluée intra-dosage (16 répliques par dosage) et inter-dosages (3 dosages, 16 répliques par dosage) avec 4 lots de kits. Les coefficients de variation moyens (CV %) obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Valeur d'anticorps IgM anti-oxLDL-β ₂ GPI moyenne de l'échantillon	CV % moyen intra-dosage	CV % moyen inter-dosages
56,5 unités	3,8 %	2,1 %
41,9 unités	4,5 %	2,6 %
4,8 unités	6,0 %	3,5 %

LIMITATIONS DU TEST

Les concentrations d'anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI obtenues au moyen de ce dosage peuvent être utilisées pour évaluer les risques de développement de maladie athérotrombotique chez les patients atteints de maladies auto-immunes systémiques et de SAPL. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic.

Des anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI peuvent être produits lorsque le stress oxydatif causé par divers états inflammatoires sous-jacents forme des complexes oxLDL-β₂GPI. D'autres états transitoires comme certaines infections bactériennes peuvent cependant être à l'origine du stress oxydatif, ainsi que de la formation de complexes oxLDL-β₂GPI et d'anticorps IgM contre ces complexes. La signification clinique exacte de ces anticorps IgM anti-oxLDL-β₂GPI fait actuellement l'objet de recherches poussées.

La présence du facteur rhumatoïde (FR) dans les échantillons patients peut parfois interférer avec les méthodes ELISA en se liant aux anticorps. La présence du FR doit être prise en compte lors de l'évaluation des résultats.

Il n'est pas recommandé d'analyser des échantillons patients contenant un excès d'hémoglobine, de lipides et/ou de bilirubine, car ces substances peuvent interférer avec les résultats du dosage.

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. Hors des États-Unis : téléphone 1-303-457-4345 ; télécopie 1-303-457-4519 ; Email : techsupport@Corgenix.com ; sinon, contacter un distributeur autorisé de Corgenix.

Anti-AtherOx™ IgM Test Kit
IgM anti-oxLDL-β₂GPI Antibody

Para uso diagnóstico in vitro

INDICACIONES

Un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM contra los complejos antigénicos formado por la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) y la β₂-glucoproteína I (β₂GPI) en suero humano. La medición de los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI puede emplearse como ayuda en la evaluación serológica del riesgo de trombosis arterial y enfermedad cardiovascular aterotrombótica en individuos con enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso diseminado (LED) y las enfermedades seudolúpicas (síndrome antifosfolípido, SAF).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las diluciones de las muestras de suero, el/los calibrador(es) y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de complejo oxLDL-β₂GPI. La incubación permite que los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI presentes en las muestras reaccionen con el complejo antigénico inmovilizado. Tras la eliminación, mediante lavado, de las proteínas séricas no unidas, se añaden anticuerpos anti-IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (HRP), que forman complejos con los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI unidos. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo una solución de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI.

Los resultados se obtienen leyendo la D.O. (densidad óptica o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministran sueros calibradores con la concentración de anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI expresada en unidades M. El usuario tiene la opción de usar un calibrador de un solo punto o una curva de calibración de tres puntos. Para la calibración de un solo punto, al dividir el valor de la concentración del suero calibrador por el valor de la D.O. de dicho calibrador se obtiene un factor de conversión. Los valores de la D.O. de las demás muestras se multiplican por el factor de conversión para obtener las concentraciones de anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI en unidades M. Para la calibración multipuntual, realice un análisis de regresión log-log con los valores del calibrador respecto a las D.O. medias del calibrador. Los resultados de los controles y de las muestras de pacientes se determinan a partir de la curva de calibración.

REACTIVOS

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

Cada equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ contiene los siguientes reactivos:

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

- 12 tiras de 8 micropocillos recubiertos de antígeno oxLDL-β₂GPI (humano) estabilizado cada una, con gradilla.
- 2 envases de 60 ml de diluyente de muestras* (solución verde).
- 3 frascos de 0,250 ml de sueros calibradores de IgM* (humano) (1-alto, 2-moderado, 3-bajo); el valor asignado en unidades M se especifica en la etiqueta del frasco. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto.
- 1 frasco de 0,250 ml de suero de control positivo de IgM* (humano); el rango esperado se especifica en la etiqueta del frasco en unidades M.
- 1 frasco de 0,250 ml de suero de control normal de IgM* (humano); el rango esperado se especifica en la etiqueta del frasco en unidades M.
- 1 envase de 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP (solución roja).

- 1 envase de 15 ml de sustrato de un componente (TMB y H₂O₂); listo para su uso.
- 1 envase de 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N).
- 2 envases (30 ml) de concentrado de lavado (PBS 33x y Tween 20)

*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro

1. El material de origen humano empleado para preparar los calibradores 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), de los VIH 1 y 2 y de la sífilis requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de 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 26-36). No tirar los residuos por el desagüe (S 29). Úsese indumentaria protectora adecuada (S 36).

OBTENCIÓN 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 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 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:

Equipo de determinación de anticuerpos IgM Anti-AtherOx™; véase una lista completa en «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 µl y 1000 µl con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado 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 las soluciones simultáneamente a 8 pocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (entre 18 y 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 de los calibradores, los controles y los sueros de prueba deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. El lector de placas debe programarse para ponerse a cero o borrarse con respecto a aire.
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. 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 8 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 en un plazo máximo de cinco minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este período 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 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 utilice componentes provenientes de equipos con diferentes números de lote.

Preparación del reactivo

Solución de lavado (PBS/Tween 20): Mida 30 ml de concentrado de lavado (PBS 33x y Tween 20) 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 PBS/Tween 20 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 se puede realizar mediante calibración de un solo punto (calibrador 2) o mediante curva de calibración de tres puntos (calibradores 1, 2, y 3). Se debe realizar un control de testigo de reactivo por cada ensayo. Se añade diluyente de muestras sin suero al pocillo. 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 1:100 de calibrador(es), los controles y las muestras de los pacientes en el diluyente de muestras (solución verde); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 1000 µl de diluyente de muestras es igual a una dilución de muestra de 1:100.
4. Añada 100 µl de calibrador(es) preparados, controles diluidos, muestras de pacientes diluidas y muestra de reactivo testigo a los micropocillos correspondientes.
5. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe el líquido de las muestras. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.

6. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado. Cada pocillo debe llenarse con solución en cada uno de los lavados. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. La gradilla debe presionarse por el centro de las partes superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Seque con papel absorbente para retirar los restos de líquido de lavado. No permita que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
7. Añada 100 µl de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana y HRP (roja) a los pocillos correspondientes al calibrador(es) de IgM, los controles, las muestras de pacientes y el reactivo testigo.
8. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe la solución de conjugado.
9. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado como en el paso 6. 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.
10. Añada 100 µl de solución de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. 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 al mismo ritmo con el que se añadió el sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y el sustrato incoloro permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a aire. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm (referencia de 650 nm, si se dispone de ella). Los valores de la D.O. deben leerse durante los 5 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Resultados

Calibración de un solo punto

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron pocillos duplicados del calibrador 2, de los controles y de las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del calibrador 2 (especificada en la etiqueta del frasco) por la D.O. o la media de la D.O. del suero calibrador.
3. Para obtener un valor en unidades M, multiplique la D.O. o los valores medios de la D.O. de cada control y muestras de pacientes por el factor de conversión.

$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Valor asignado del calibrador 2}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 2 (D.O.)}}$$

$$\text{Valor de la muestra} = \text{Factor de conversión} \times \text{absorbancia de la muestra (D.O.)}$$

4. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo, los resultados obtenidos no serán válidos.
5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase «Control de calidad») antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

Calibración de la curva multipuntual.

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron pocillos duplicados de los calibradores, de los controles y de las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión log-log con los tres valores del calibrador (Véase en la etiqueta del frasco las unidades M) respecto a las D.O. de cada calibrador.
3. La curva del calibrador puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas. Al generar la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados sobre papel de gráficas log-log.
4. Determine los valores de los controles y las muestras de pacientes obtenidos a partir de la curva del calibrador.
5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase «Control de calidad») antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

CONTROL DE CALIDAD

1. El valor de la D.O. o el valor medio de la D.O. del calibrador 2 debe ser 0,400 como mínimo para garantizar que el equipo funciona adecuadamente. Las lecturas de D.O. del calibrador 2 inferiores a 0,400 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
2. El valor D.O. o el valor medio de la D.O. del reactivo testigo debe ser inferior a 0,100 cuando el espectrofotómetro se haya borrado adecuadamente con respecto a un pocillo de aire. 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 anticuerpos IgM anti-oxLDL- β_2 GPI obtenidos con los sueros de control deben estar dentro de los rangos indicados en las etiquetas del envase. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Los valores de la D.O. de los duplicados (si se utilizaron) de los controles y las muestras de los pacientes deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios rangos normales para la población de pacientes correspondiente.
6. Las muestras con valores superiores a las 100 unidades M pueden especificarse como «más de 100 unidades M». Alternativamente, se puede diluir la muestra de nuevo a 1:10 y volver a realizar el ensayo. El valor resultante en unidades M se multiplicaría entonces por un factor de 10.

RANGO NORMAL

Se analizaron muestras de suero procedentes de 100 donantes sanos con 4 lotes del equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™. Se determinó que el valor medio de los anticuerpos IgM anti-oxLDL- β_2 GPI en esta población era de 11 unidades M, con una desviación estándar de 6,4 unidades. El percentil 95 fue de 24,3 unidades M y la media más 2DE fue de 23,7 unidades M. Se estableció un rango normal de entre 0 y 20 G basándose en ambos cálculos procedentes de la población normal.

RANGO NORMAL PARA ANTICUERPOS IgM ANTI-oxLDL- β_2 GPI = 0–20 UNIDADES M

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad clínica

Para determinar la especificidad clínica del ensayo, se examinaron muestras de suero obtenidas de 133 individuos sanos con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™. Se determinó que el valor medio de los anticuerpos IgM anti-oxLDL- β_2 GPI en esta población era de 8 unidades M, con una desviación estándar de 5,6 unidades. 8 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una especificidad clínica global del 94%.

Sensibilidad clínica

Pacientes autoinmunes

Se analizaron muestras de suero obtenidas de 92 individuos con LED no seleccionados con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ para determinar la sensibilidad clínica del ensayo. Se determinó que el valor medio de anticuerpos IgM anti-oxLDL- β_2 GPI en esta población era de 6,8 unidades M, con una desviación estándar de 7,7 unidades. 5 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una sensibilidad clínica global del 5%.

Se analizaron muestras de suero obtenidas de 30 individuos con LED seleccionados y con enfermedad cardiovascular con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ para determinar la sensibilidad clínica del ensayo. Se determinó que el valor medio de anticuerpos IgM anti-oxLDL- β_2 GPI en esta población era de 9,5 unidades M, con una desviación estándar de 11,4 unidades. 2 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una sensibilidad clínica global del 7%. Las muestras de suero de 31 pacientes seleccionados con enfermedad cardiovascular y sin LED (controles) mostraron un valor medio de 4 unidades M con una desviación estándar de 3,3 unidades y una sensibilidad del 0%. Un grupo de 27 controles sanos mostró un valor medio de 6,2 unidades M con una desviación estándar de 4 unidades y una sensibilidad del 0%.

Se analizaron muestras de suero obtenidas de 11 individuos con SAF secundario con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ para determinar la sensibilidad clínica del ensayo. Se determinó que el valor medio de los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI en esta población era de 13,8 unidades M, con una desviación estándar de 12 unidades. 3 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una sensibilidad clínica global del 27%. Las muestras de suero de 31 pacientes con LED y sin SAF (controles) mostraron un valor medio de 5,4 unidades M con una desviación estándar de 4,4 unidades y una sensibilidad del 0%.

Se analizaron muestras de suero obtenidas de 54 individuos con SAF con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ para determinar la sensibilidad clínica del ensayo. Se determinó que el valor medio de los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI en esta población era de 13.2 unidades M, con una desviación estándar de 15.5 unidades. 11 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una sensibilidad clínica global del 20.4%.

Se examinaron muestras de suero obtenidas de 80 individuos no seleccionados con AR con el equipo de determinación de IgM Anti-AtherOx™ para determinar la sensibilidad clínica del ensayo. Se determinó que el valor medio de los anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI en esta población era de 19 unidades M, con una desviación estándar de 15,8 unidades. 32 muestras de suero resultaron positivas respecto al rango normal establecido de 0–20 unidades M, lo cual supone una sensibilidad clínica global del 40%. Los valores de anticuerpos IgM anti-AtherOx™ no se correlacionaron con los valores del factor reumatoide IgM en la población con AR (R=0,178).

Precisión

Se evaluó el equipo de determinación IgM Anti-AtherOx™ en 4 lotes de equipos para obtener la precisión de los valores intra-ensayo (16 repeticiones por ensayo) e inter-ensayo (3 ensayos, 16 repeticiones por ensayo). En la siguiente tabla se resumen los promedios de los coeficientes de las variaciones (% de CV) obtenidos.

Valor medio de anticuerpos IgM anti-oxLDL-β ₂ GPI de la muestra	CV% promedio intra-ensayo	CV% promedio inter-ensayo
56,5 unidades	3,8%	2,1%
41,9 unidades	4,5%	2,6%
4,8 unidades	6,0%	3,5%

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI obtenidas con este ensayo pueden emplearse para evaluar el riesgo de desarrollar enfermedad aterotrombótica en pacientes con trastornos autoinmunes sistémicos y SAF. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, en los datos obtenidos en la exploración física y en otros procedimientos diagnósticos.

Cuando el estrés oxidativo causado por condiciones inflamatorias subyacentes forma complejos oxLDL-β₂GPI se pueden producir anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI. Sin embargo, otras condiciones transitorias, tales como determinadas infecciones bacterianas pueden causar estrés oxidativo, formación de complejos oxLDL-β₂GPI, y anticuerpos IgM para dichos complejos. La importancia clínica exacta de estos anticuerpos IgM anti-oxLDL-β₂GPI continua bajo investigación.

La presencia de factor reumatoide (FR) en las muestras de pacientes puede a veces interferir con los métodos ELISA al unirse a los anticuerpos. Al evaluar los resultados debe considerarse la presencia de FR.

No se recomienda que se analicen muestras de pacientes con exceso de hemoglobina, lípidos, o bilirrubina ya que estas sustancias pueden interferir con los resultados del ensayo.

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, 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, escriba a la dirección de correo electrónico techsupport@Corgenix.com o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

Anti-AtherOx™ IgM Test Kit IgM anti-oxLDL-β₂GPI Antibody

Per uso diagnostico in vitro

USO PREVISTO

Dosaggio immunoenzimatico ELISA per la determinazione della presenza degli anticorpi IgM diretti contro i complessi formati dall'interazione tra la lipoproteina a bassa densità ossidata (oxLDL) e la β₂-glicoproteina I (β₂GPI) nel siero umano. La misurazione degli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI può essere di ausilio nella valutazione del rischio sierologico di sviluppo della trombosi arteriosa e della malattia cardiovascolare aterotrombotica negli individui affetti da malattie autoimmuni sistemiche come l'artirite reumatoide (RA), il lupus eritematoso sistemico (LES) e le malattie simili al lupus come la sindrome da anti-fosfolipidi (APS).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. I campioni di siero, i calibratori e i controlli diluiti vengono incubati in micropozzetti rivestiti con il complesso oxLDL-β₂GPI. L'incubazione consente agli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI presenti nei campioni di reagire con il complesso antigenico immobilizzato. Dopo la rimozione mediante lavaggio delle proteine sieriche non legate, si aggiungono gli anticorpi anti-IgM umane marcati con perossidasi di rafano (HRP), per dar luogo alla formazione di complessi con gli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI legati. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene dosato mediante l'aggiunta di una soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H₂O₂) come substrato cromogeno. Nei pozzetti si sviluppa una colorazione di intensità proporzionale alla concentrazione sierica degli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI.

I risultati si ottengono leggendo in uno spettrofotometro la densità ottica (o assorbanza) di ciascun pozzetto. Vengono forniti sieri di calibrazione con la concentrazione di anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI espressa in unità M. L'utente può usare una calibrazione a punto singolo o una curva di calibrazione a tre punti. Nella calibrazione a punto singolo, per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione del siero di calibrazione per il valore di densità ottica del calibratore. I valori di densità ottica degli altri campioni vengono moltiplicati per il fattore di conversione per ottenere le concentrazioni di anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI espresse in unità M. Per la calibrazione a più punti, eseguire l'analisi della regressione doppia logaritmica con i valori dei calibratori in funzione dei valori medi della densità ottica dei calibratori. I risultati dei controlli e dei campioni dei pazienti sono determinati dalla curva di calibrazione.

REAGENTI

Conservare a 2–8 °C. Non congelare.

Ciascun kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™ contiene i seguenti reagenti

(i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit).

- 12 strisce da 8 pozzetti (con telaio) rivestiti con antigene oxLDL-β₂GPI stabilizzato (umano)
- 2 flaconi (60 ml) di diluente per campione* (soluzione verde)
- 3 fiale (0,250 ml) di siero di calibrazione* per IgM (1 alto, 2 moderato, 3 basso) (umano); vedere l'etichetta della fiala per il valore assegnato in unità M Il calibratore 2 va usato per la calibrazione a punto singolo
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo positivo* per IgM (umano); vedere l'etichetta della fiala per il range atteso in unità M
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo normale* per IgM (umano); vedere l'etichetta della fiala per il range atteso in unità M
- 1 flacone (15 ml) di soluzione contenente anticorpi di capra anti-IgM umane coniugati con HRP (soluzione rossa)

- 1 flacone (15 ml) di substrato monocomponente (TMB e H₂O₂); pronto per l'uso.
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di arresto (acido solforico 0,36 N)
- 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. Il materiale di origine umana usato per la preparazione dei calibratori e dei controlli inclusi in questo kit è stato analizzato con i test richiesti dalla FDA ed è risultato negativo 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 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 noto che la sodio azide, a contatto con rame o piombo, può dare luogo alla formazione di azidi metalliche, potenzialmente 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 mono-componente può causare irritazione agli occhi e alla 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 26-36). Non gettare i residui nelle fognature (S 29). 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 e il siero va separato dalla frazione 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 siero emolizzato, itterico o lipemico. I campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima dell'analisi.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™; vedere la sezione "Reagenti" per un elenco completo dei componenti.

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata per la preparazione della soluzione di lavaggio PBS/Tween 20 (1 litro)
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione in grado di dosare 10 µl e 1000 µl, con punte appropriate
- Vetreria assortita adatta 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 la lettura di piastre in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanale per la dispensazione simultanea in 8 pozzetti

Note procedurali

1. Prima dell'uso, consentire la stabilizzazione dei campioni di siero e dei reagenti del kit a temperatura ambiente (18–26 °C); miscelarli bene evitando la formazione di schiuma. Riporre al più presto in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e dei sieri di analisi devono essere eseguite solo immediatamente prima del dosaggio.
3. Il lettore di piastre va azzerato contro l'aria.
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 erogato da un flacone di plastica morbida con punta larga. È anche possibile usare un sistema di lavaggio automatico delle piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - Eventuali residui di PBS/Tween 20 possono causare uno sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di effettuare la dispensazione simultanea in 8 pozzetti. Ciò aumenta la rapidità dell'analisi e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Il preciso controllo dei tempi in tutte le fasi dell'analisi è essenziale. Tutti i 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 inizia quando è terminata l'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti va eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione più alte o più basse della temperatura ambiente normale (18–26 °C) possono generare risultati errati.
11. Durante il prelievo delle aliquote dalle fiale, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
13. Non utilizzare componenti di kit appartenenti a lotti differenti.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio (PBS/Tween 20): dosare 30 ml di soluzione di lavaggio concentrata (33X PBS/Tween 20) e aggiungere acqua distillata quanto basta per ottenere 1 litro. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS/Tween 20 inutilizzata in frigorifero a 2–8 °C. Eliminare la soluzione se presenta segni di contaminazione microbica o contaminazione crociata.

Procedura di analisi

1. Il dosaggio può essere eseguito con una calibrazione a punto singolo (calibratore 2) o con una curva di calibrazione a tre punti (sieri di calibratore 1, 2 e 3). Per ciascun dosaggio, analizzare un bianco reagente. Dispensare nel pozzetto il diluente per campione senza siero. 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 in rapporto 1:100 dei calibratori, dei controlli e dei campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione (soluzione verde); ad esempio: 10 µl di campione aggiunto a 1000 µl di diluente per campione equivale ad una diluizione del campione pari a 1:100.
4. Aggiungere 100 µl di calibratori preparati, controlli diluiti, campioni diluiti e bianco reagente ai micropozzetti appropriati.
5. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti per eliminare il liquido dei campioni. Evitare di contaminare con i campioni gli altri pozzetti.
6. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio. In ciascuna fase del lavaggio, tutti i pozzetti vanno riempiti completamente con la soluzione di lavaggio. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Per trattenere i moduli dei micropozzetti durante il lavaggio, comprimere il telaio ponendo un dito al centro del bordo inferiore e uno al centro del bordo superiore. Eliminare il liquido residuo picchiando su carta assorbente. Evitare l'essiccazione dei pozzetti tra le varie fasi dell'analisi.

7. Aggiungere 100 µl di soluzione contenente anticorpi anti-IgM umane coniugati con HRP (soluzione rossa) ai pozzetti dei calibratori per IgM, dei controlli, dei campioni e del bianco reagente.
8. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti per eliminare la soluzione di coniugato.
9. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio, come descritto al punto 6. Con un movimento deciso, drenare il liquido e picchiettare su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
10. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato monocomponente a ciascun pozzetto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. 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 (acido solforico 0,36 N) 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 in cui si è precedentemente aggiunto il substrato. La soluzione di substrato blu diventa gialla, mentre il substrato incolore rimane inalterato. Azzerare il lettore di piastre usando un pozzetto contenente solo aria. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm (con riferimento a 650 nm, se disponibile). I valori di densità ottica devono essere misurati entro 5 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

Calibrazione a punto singolo

1. Se si sono analizzati il calibratore 2, i controlli e il campione in duplicato, calcolare le densità ottiche medie.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione del calibratore 2 (riportata sull'etichetta della fiala) per la densità ottica (o per la densità ottica media) del calibratore.
3. Moltiplicare la densità ottica (o la densità ottica media) di ciascun controllo e del campione del paziente per il fattore di conversione per ottenere un valore espresso in unità M.

$$\text{Fattore di conversione} = \frac{\text{Valore assegnato del calibratore 2}}{\text{Assorbanza del calibratore 2 (densità ottica)}}$$

$$\text{Valore del campione} = \text{Fattore di conversione} \times \text{assorbanza del campione (densità ottica)}$$

4. L'uso di un fattore di conversione di un altro dosaggio invalida i risultati.
5. Prima di refertare i risultati delle analisi, assicurarsi che tutti i parametri di controllo di qualità siano stati osservati (vedere la sezione Controllo di qualità).

Calibrazione con curva a più punti

1. Se si sono analizzati i calibratori, i controlli e il campione in duplicato, calcolare le densità ottiche medie.
2. Eseguire l'analisi della regressione doppia logaritmica con i tre valori dei calibratori (per le unità M, vedere le etichette delle fiale) rispetto alla densità ottica di ciascun calibratore.
3. La curva di calibrazione può essere tracciata automaticamente usando un software convalidato o manualmente su carta millimetrata. Durante la generazione manuale della curva, tracciare la linea di migliore adattamento attraverso i punti tracciati su carta bilogaritmica.
4. Determinare i valori del controllo e del campione dalla curva di calibrazione.
5. Prima di refertare i risultati delle analisi, assicurarsi che tutti i parametri di controllo di qualità siano stati osservati (vedere la sezione Controllo di qualità).

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Per garantire il corretto funzionamento del kit, il valore della densità ottica o il valore della densità ottica media del calibratore 2 deve essere almeno 0,400. Un risultato di densità ottica del calibratore 2 minore di 0,400 indica che il kit non è più valido.
2. Quando lo spettrofotometro è stato correttamente azzerato usando un pozzetto contenente solo aria, il valore della densità ottica o della densità ottica media del bianco reagente deve essere inferiore a 0,100. Valori superiori a 0,100 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente o un insufficiente lavaggio della piastra.

3. I valori degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI ottenuti per i sieri di controllo devono rientrare nei range indicati sulle etichette delle rispettive fiale. Piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range sono accettabili.
4. I valori di densità ottica dei duplicati (se analizzati) dei controlli o dei campioni devono rimanere entro il 20% del valore della densità ottica media per i campioni con valori di assorbanza maggiori di 0,200.
5. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare i propri range normali per la popolazione di pazienti appropriata.
6. I campioni con valori superiori a 100 unità possono essere refertati come "superiori a 100 unità M". In alternativa, il campione può essere ulteriormente diluito in rapporto 1:10 e nuovamente analizzato. Il valore risultante in unità M va quindi moltiplicato per un fattore di 10.

RANGE NORMALE

Campioni di siero provenienti da 100 donatori di sangue sani sono stati analizzati con 4 lotti del kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™. È stato determinato che il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI di questa popolazione è pari a 11 unità M, con una deviazione standard di 6,4 unità. Il 95° percentile è stato pari a 24,3 unità M e la media + 2DS è stata di 23,7 unità M. È stato stabilito un range normale di 0–20 unità M basato su entrambi i calcoli eseguiti sulla popolazione normale.

RANGE NORMALE DEGLI ANTICORPI IgM ANTI-oxLDL- β_2 GPI = 0–20 UNITÀ M

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Specificità clinica

I campioni di siero provenienti da 133 individui sani sono stati analizzati con il kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la specificità clinica del dosaggio. È stato determinato che il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI di questa popolazione è pari a 8 unità M, con una deviazione standard di 5,6 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 8 campioni di siero sono risultati positivi, generando una specificità clinica complessiva pari al 94%.

Sensibilità clinica

Pazienti affetti da malattie autoimmuni

I campioni di siero provenienti da 92 pazienti non selezionati affetti da LES sono stati analizzati con il kit per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la sensibilità clinica del dosaggio. Il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI di questa popolazione è risultato pari a 6,8 unità M, con una deviazione standard di 7,7 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 5 campioni di siero sono risultati positivi, generando una sensibilità clinica complessiva pari al 5%.

I campioni di siero provenienti da 30 pazienti selezionati affetti da LES e da malattia cardiovascolare (CVD) sono stati analizzati con il kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la sensibilità clinica del dosaggio. Il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI di questa popolazione è risultato pari a 9,5 unità M, con una deviazione standard di 11,4 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 2 campioni di siero sono risultati positivi, generando una sensibilità clinica complessiva pari al 7%. I campioni di siero provenienti da 31 pazienti selezionati affetti da CVD ma non da LES (controlli) hanno generato un valore medio di 4 unità M, con una deviazione standard di 3,3 unità e una sensibilità dello 0%. Un gruppo di 27 pazienti di controllo sani ha generato un valore medio di 6,2 unità M, con una deviazione standard di 4 unità e una sensibilità dello 0%.

I campioni di siero provenienti da 11 pazienti affetti da APS secondaria sono stati analizzati con il kit per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la sensibilità clinica del dosaggio. Il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL- β_2 GPI di questa popolazione è risultato pari a 13,8 unità M, con una deviazione standard di 12 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 3 campioni di siero sono risultati positivi, generando una sensibilità clinica complessiva pari al 27%. I campioni di siero provenienti da 31 pazienti affetti da LES ma non da APS (controlli) hanno generato un valore medio pari a 5,4 unità M, con una deviazione standard di 4,4 unità e una sensibilità dello 0%.

I campioni di siero provenienti da 54 pazienti affetti da APS sono stati analizzati con il kit per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la sensibilità clinica del dosaggio. Il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI di questa popolazione è risultato pari a 13.2 unità M, con una deviazione standard di 15.5 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 11 campioni di siero sono risultati positivi, generando una sensibilità clinica complessiva pari al 20.4%.

I campioni di siero provenienti da 80 pazienti non selezionati affetti da artrite reumatoide sono stati analizzati con il kit per IgM Anti-AtherOx™ per determinare la sensibilità clinica del dosaggio. È stato determinato che il valore medio degli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI di questa popolazione è pari a 19 unità M, con una deviazione standard di 15,8 unità. Rispetto al range normale stabilito di 0–20 unità M, 32 campioni di siero sono risultati positivi, generando una sensibilità clinica complessiva pari al 40%. I valori degli anticorpi rilevati mediante l'analisi per IgM Anti-AtherOx™ non hanno mostrato alcuna correlazione con i titoli degli anticorpi IgM per il fattore reumatoide nella popolazione affetta da tale patologia (R=0,178).

Precisione

Il kit di analisi per IgM Anti-AtherOx™ è stato valutato per quanto riguarda la precisione dei valori intra-dosaggio (16 replicati per analisi) e inter-dosaggio (3 analisi, 16 replicati per analisi) usando 4 lotti del kit di analisi. Nella tabella che segue sono riassunti i coefficienti di variazione (CV%) medi ottenuti.

Valore medio dell'anticorpo IgM anti-oxLDL-β ₂ GPI del campione	CV% intra-dosaggio	CV% inter-dosaggio
56,5 unità	3,8%	2,1%
41,9 unità	4,5%	2,6%
4,8 unità	6,0%	3,5%

LIMITI DEL DOSAGGIO

I livelli di anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI ottenuti con questa analisi possono essere usati per valutare il rischio di sviluppo di malattia aterotrombotica nei pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche e APS. Ogni medico deve interpretare questi risultati nel quadro dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altre procedure diagnostiche.

Gli anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI possono essere prodotti quando lo stress ossidativo causato da varie condizioni infiammatorie latenti provoca la formazione di complessi oxLDL-β₂GPI. Tuttavia, altre condizioni transitorie, come alcune infezioni batteriche, possono causare stress ossidativo, la formazione di complessi oxLDL-β₂GPI e la conseguente produzione di anticorpi IgM diretti contro tali complessi. L'esatto significato clinico di questi anticorpi IgM anti-oxLDL-β₂GPI è in corso di studio.

La presenza di fattore reumatoide nei campioni dei pazienti può talvolta provocare interferenza nel contesto delle analisi ELISA legandosi agli anticorpi. La presenza di fattore reumatoide va quindi presa in considerazione durante la valutazione dei risultati.

L'analisi di campioni contenenti emoglobina, lipidi e/o bilirubina in quantità eccessiva non è consigliata in quanto queste sostanze possono interferire con i risultati dell'analisi.

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 il servizio di assistenza tecnica o per il servizio di assistenza clienti, negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661 (numero verde). Dagli altri Paesi, chiamare il numero +1-303-457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519, un messaggio di posta elettronica all'indirizzo techsupport@Corgenix.com, o rivolgersi al distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Steinberg D. Low-density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-6.
2. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 707-27.
3. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
4. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Med* 2002; 8: 1211-7.
5. Rose N, Afanasyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. *Nat Med* 2003; 9: 641-2.
6. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84: 1086-95.
7. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low-density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 1004-8.
8. Pratico D, Ferro D, Iuliano, Rokach J, Conti F, Valesini G, Fitzgerald GA, Violi F. Ongoing prothrombotic state in patients with antiphospholipid antibodies: a role for increased lipid peroxidation. *Blood* 1999; 93: 3401-7.
9. Ames PRJ, Alves J, Murat I, Isenberg DA, Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology* 1999; 38: 529-34.
10. Bruckdorfer KR, Hillary JB, Bunce T, Vancheeswaran R, Black CM. Increased susceptibility to oxidation of low-density lipoproteins isolated from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1060-7.
11. Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1146-50.
12. De Cristofaro R, Rocca B, Vitacolonna E, Falco A, Marchesani P, Ciabattini G, Landolfi R, Patrono C, Davi G. Lipid and protein oxidation contribute to a prothrombotic state in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 250-6.
13. Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Arii K, Kumon Y, Hashimoto K. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004; 53: 297-302.
14. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of β_2 -glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 569-73.
15. Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, Furukawa J, Kaihara K, Inagaki J, Atsumi T, Sakairi N, Yasuda T, Voelker DR, Koike T. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low-density lipoprotein by macrophages. *J Lipid Res* 2001; 42: 697-709.
16. Liu Q, Kobayashi K, Inagaki J, Sakairi N, Iwado A, Yasuda T, Koike T, Voelker DR, Matsuura E. ω -carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for β_2 -glycoprotein I and mediate antibody-dependent uptake of oxidized LDL by macrophages. *J Lipid Res* 2002; 43: 1486-95.
17. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, Yamamoto I, Yasuda T, Khamashta MA, Hughes GRV, Koike T, Voelker DR, Matsuura E. Circulating oxidized LDL forms complexes with β_2 -glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res* 2003; 44: 716-26.
18. George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J, Barshack I, Kopolovic J, Shoenfeld Y. Immunolocalization of β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. *Circulation* 1999; 99: 2227-30.
19. Matsuura E, Lopez LR. Are oxidized LDL/ β_2 -glycoprotein I complexes pathogenic antigens in autoimmune-mediated atherosclerosis? *Clin Dev Immunol* 2004; 11:103-11.
20. Matsuura E, Lopez LR. Oxidized low-density lipoprotein complexed with β_2 -glycoprotein I as a common metabolic form in atherogenesis and autoimmune-mediated atherosclerosis. In "Focus on Atherosclerosis Research", Editor Leon V Clark, Nova Science Publishers (NY), pp.91-113 (2004).
21. Lopez LR, Matsuura E. Autoimmune-mediated atherosclerosis: Pathogenic role of oxLDL/ β_2 GPI complexes. In "Recent Research Development Lipids", Transworld Research Network, 7: 1-26 (2004).
22. Vaarala O. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. *Lupus* 1996; 5: 442-7.
23. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 338-46.
24. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, Cote R, Grover SA, Fortin PR, Clarke AE, Senecal JL. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2331-7.
25. Schattner A, Liang MH. The cardiovascular burden of lupus; a complex challenge. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1507-10.
26. Lopez D, Kobayashi K, Merrill JT, Matsuura E, Lopez LR. IgG Autoantibodies against β_2 -glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2003; 10:203-11.
27. Lopez LR, Dier, KJ, Lopez D, Merrill JT, Fink CA. Anti- β_2 -glycoprotein I and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 142-9.
28. Lopez D, Garcia-Valladares I, Palafox-Sanchez C, Garcia De La Torre I, Kobayashi K, Matsuura E, Lopez LR. Oxidized low-density lipoprotein/ β_2 -glycoprotein I complexes and autoantibodies to oxLig-1/ β_2 -glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 426-36.
29. Lopez LR, Kuca J, Hurlley B, Fink C, Matsuura E. IgG and IgM anti-oxLDL/ β_2 GPI antibodies in patients with autoimmune disorders and anti-phospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3 (Suppl 2): 84.

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-mächtigter	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

Anti-AtherOx™ is a registered trademark of Corgenix, Inc.

©2006, Corgenix, Inc.

11943 03
Effective: 2006-07-25