

LABELING

Title: **REAADS aPS IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST
KIT PACKAGE INSERT**

Document Number: 13030901

Supersedes/Date: 2006-09-28

CO No.: 07-0624

Revision: 21

QA Approval/Date: K.Hassler 2007-12-19

Effective Date: 2008-01-11

Dimensions: Flat 8½" wide X 11" long

Folded / Booklet Format 5 ½" X 8 ½"

Colors: Black Text

Paper Stock: White

REAADS®
ANTI-PHOSPHATIDYLSERINE IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST KIT

For *In Vitro* Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of IgG and IgM anti-phosphatidylserine antibodies in human serum or citrated plasma (3.2% sodium citrate).

INTENDED USE

Detection and semi-quantitation of anti-phosphatidylserine antibodies in individuals with systemic lupus erythematosus (SLE) and lupus-like disorders (anti-phospholipid syndrome).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ANTI-PHOSPHATIDYLSERINE TEST

Anti-phospholipid antibodies are a heterogeneous group of immunoglobulins that bind to several anionic phospholipids, including cardiolipin and phosphatidylserine.^{1,2} High serum levels of anti-phospholipid antibodies are frequently detected in patients with autoimmune (i.e., SLE) and non-autoimmune diseases, as well as in apparently healthy individuals.^{3,4} These antibodies have been associated with an increased risk for recurrent arterial and venous thrombotic events, thrombocytopenia and fetal loss. These manifestations are the main features of the anti-phospholipid syndrome.^{5,6}

Anti-phospholipid antibodies are detected by either ELISAs using cardiolipin as the antigen (anti-cardiolipin antibodies)⁷ or coagulation assays (lupus anticoagulants).⁸ Unlike cardiolipin, phosphatidylserine is a more physiologically relevant phospholipid due to its presence in cell membranes of endothelial cells and platelets⁹ and its role in the coagulation cascade.¹⁰ The detection of anti-phosphatidylserine (aPS) antibodies by ELISA has been recommended for the serological diagnosis of anti-phospholipid syndrome.⁸ Patients with positive reactions to both cardiolipin and phosphatidylserine were more likely to have clinical complications than those positive for only one.¹¹ Higher prevalence and mean serum levels of IgG anti-phosphatidylserine antibodies have been reported in autoimmune patients.¹² In addition, anti-phosphatidylserine antibodies in SLE patients correlated with clinical manifestations of anti-phospholipid syndrome¹³ and their pathogenic role has been demonstrated in a murine model.¹⁴

Autoimmune anti-phospholipid antibodies require a serum cofactor (β_2 -glycoprotein I) for optimal binding.^{15,16} Antibodies to phosphatidylserine also require β_2 -glycoprotein I.¹⁷ The REAADS Anti-phosphatidylserine Test Kit uses the well known ELISA format to detect anti-phosphatidylserine antibodies in human serum and provides rapid, highly reproducible, accurate, and objective results. The values for IgG anti-phosphatidylserine antibodies and IgM anti-phosphatidylserine antibodies are reported separately.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. The concentration of IgG anti-phosphatidylserine antibodies and IgM anti-phosphatidylserine antibodies must be determined separately. Diluted serum or plasma samples, calibrator sera, and controls are incubated in phosphatidylserine coated microwells. β_2 -glycoprotein I is provided in the sample diluent. Incubation allows the anti-phosphatidylserine (aPS) antibodies present in the samples to react with the immobilized antigen. After the removal of unbound serum or plasma proteins by washing, antibodies specific for human IgG or IgM, labeled with horseradish peroxidase (HRP), are added forming complexes with the phosphatidylserine bound antibodies. Two enzyme-conjugated antibody solutions are provided, one specific for human IgG antibodies and one specific for human IgM antibodies. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of a single solution containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the serum concentration of anti-phosphatidylserine (aPS) antibodies.

Results are obtained by reading the O.D. (optical density or absorbance) of each well in a

spectrophotometer. Calibrator sera are provided with the IgG and IgM anti-phosphatidyl-serine antibody concentrations expressed in GPS (IgG antiphosphatidylserine) or MPS (IgM anti-phosphatidylserine) units, respectively. The user has the option of running either a single point calibrator or a four-point calibration curve. For single point calibration, dividing the concentration value of the calibrator sera by the O.D. value of the calibrator provides a conversion factor (one for IgG and one for IgM). The O.D. values of the other samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgG and IgM anti-phosphatidylserine antibody concentrations in GPS or MPS units. For multipoint calibration, perform a linear regression analysis with calibrator values against calibrator O.D.s. Control and patient results are determined from the calibration curve. These units are traceable to the reference preparations of the Louisville Antiphospholipid Laboratory.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Anti-phosphatidylserine 96-microwell Test Kit contains the following reagents (**volumes may vary depending on the kit size and configuration**):



- 12x8 Phosphatidylserine (from porcine brain) coated microwells, with frame.
- 60 mL Sample Diluent I (green solution); contains bovine calf serum.*
- 0.250 mL IgG Calibrator Sera* (1-high, 2-moderate, 3-low) (human); see vial label for antibody concentration in GPS units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 0.250 mL IgM Calibrator Sera* (1-high, 2-moderate, 3-low) (human); see vial label for antibody concentration in MPS units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 0.250 mL IgG Positive Control Serum* (human); see vial label for expected GPS range.
- 0.250 mL IgM Positive Control Serum* (human); see vial label for expected MPS range.
- 0.250 mL Normal Control Serum* (human); see vial label for expected GPS and MPS ranges.
- 15 mL anti-human IgG (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (blue solution); contains 0.01% thimerosal and gentamycin sulfate as preservatives.
- 15 mL anti-human IgM (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution); contains 0.01% thimerosal and gentamycin sulfate as preservatives.
- 15 mL One Component Substrate (TMB/ H₂O₂); ready to use.
- 15 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 2 bottles (30 mL) Wash Concentrate (33X PBS).

***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, and HIV 1 & 2 by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Certain components of this product contain sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.
6. One component substrate can cause irritation to the eyes and skin. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.

7. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).
- Irritant . Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Plasma collected with 3.2% sodium citrate may be used. Blood should be collected by venipuncture and the plasma immediately separated from the cells by centrifugation at 1500g for 10 minutes. The supernatant must be carefully removed after centrifugation to avoid contamination with platelets. Repeating the centrifugation and separation steps may be advisable to minimize platelet contamination. Lysed or aged platelets can react with anti-phospholipid antibodies leading to aberrant results. If not tested immediately, plasma samples should be stored as described for serum.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided

REAADS Anti-phosphatidylserine Test Kit; see “Reagents” for a complete list.

Materials Required but not Supplied

- Reagent grade water to prepare PBS wash solution and to zero or blank the plate reader during the final assay step
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 µL and 1000 µL, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for 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. A single water blank well can be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 µL of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to zero or blank against air or a water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution into the bottom of the microwells from a plastic squeeze bottle with a wide tip. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS 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 Tween 20 or other detergents in this assay.
13. Do not use kit components beyond expiration date.
14. Do not use kit components from different kit lot numbers.

REAGENT PREPARATION

Wash Solution (PBS): Measure 30 mL of Wash Concentrate (33X PBS) and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS solution in the refrigerator at 2-8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or cross contamination.

ASSAY PROCEDURE

1. The assay can be performed with a single point calibration (Calibrator 2) or a four-point calibration curve (Calibrators 1, 2, and 3 plus sample diluent/reagent blank as Calibrator 4 equal to 0 GPS or 0 MPS units). A reagent blank control should also be run for each conjugate, IgG and IgM, with the single point and multipoint calibration method; 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 1:50 dilution of the calibrators, controls, and patient samples in sample diluent (green solution); e.g. 10 μ L sample added to 490 μ L Sample Diluent I equals a 1:50 sample dilution.
4. Add 100 μ L of diluted calibrators (including the reagent blank/Calibrator 4), controls, and patient sample(s) to the appropriate microwells.
5. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
6. Wash 4 times with PBS. Each well should be filled with PBS 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 anti-human IgG Conjugate (blue) to the wells corresponding to the IgG calibrator, controls, reagent blank, and patient samples. Add 100 μ L anti-human IgM Conjugate (red) to the wells corresponding to the IgM calibrator, controls, reagent blank, and patient samples.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solutions. Take care to prevent cross-contamination of IgG and IgM Antibody Conjugate Solutions.
9. Wash 4 times with PBS 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 Substrate to each well and incubate for 10 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 sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Add the 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 solution will remain colorless. Blank or zero the plate reader against air or a water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm (and 650 nm reference if dual beam). The O.D. values should be measured within 5 minutes after the addition of Stopping Solution.

RESULTS

Single Point Calibration

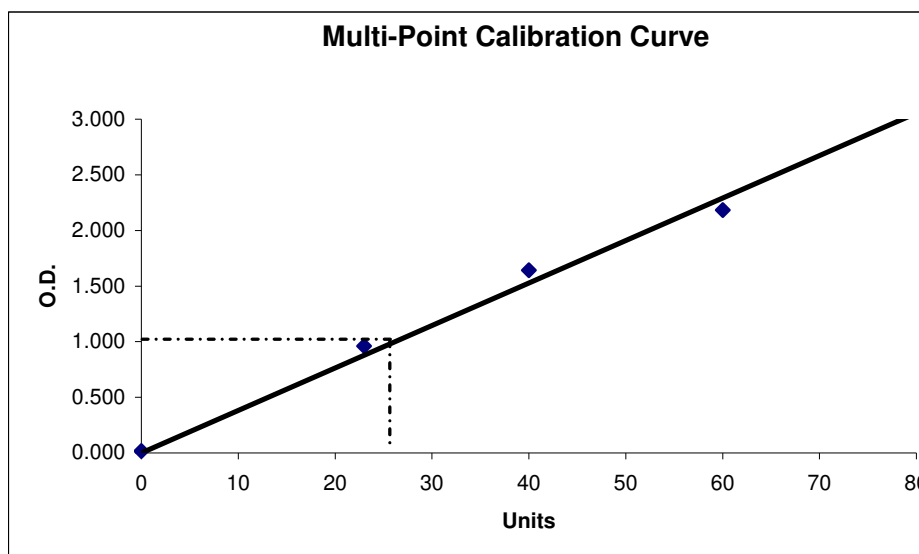
1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of Calibrator 2, controls and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on the vial label) by the O.D. or mean O.D. value of the calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the O.D. or mean O.D. values for each of the controls and patient samples by the appropriate conversion factor to obtain a concentration value in GPS or MPS units.

$$\text{Conversion Factor} = \frac{\text{Anti-phosphatidylserine concentration of Calibrator 2 (GPS or MPS)}}{\text{Absorbance value of the Calibrator 2 (O.D. - G or M)}}$$
$$\text{Anti-phosphatidylserine concentration of sample} = \text{Conversion Factor} \times \text{Absorbance of the Sample (O.D.)}$$

4. The conversion factor must be calculated for both calibrators for each assay run. Using a conversion factor from another assay or interchanging GPS and MPS Conversion Factors will invalidate the results.

Multi-Point Curve Calibration

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



Using the example calibration curve provided, a specimen O.D. of 1.000 at 450 nm would correspond to a calculated value of 26.2 units. The calibration curve provided is an example only and should not be used to calculate patient results. A new calibration curve should be performed with every test run.

Quality Control

1. The O.D. value of Calibrator 2 should be at least 0.600 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator 2 O.D. readings of less than 0.600 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
2. The O.D. of Calibrator 4 or reagent blank should be less than 0.100 when the spectrophotometer has been blanked against air or a water well. Readings greater than 0.100 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The anti-phosphatidylserine 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. O.D. values for duplicates (if performed) of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
5. Each laboratory should periodically determine its own normal cut-off values for the appropriate population of patients. See Performance Characteristics, Clinical Specificity, as an example.
6. Samples with anti-phosphatidylserine values greater than 100 GPS or 80 MPS may be reported as "greater than 100 GPS or 80 MPS".
7. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control section) before reporting test results.

NORMAL RANGE

Serum samples from 130 healthy blood donors were tested for IgG anti-phosphatidylserine and 128 for IgM anti-phosphatidylserine (aPS) antibodies; the following normal ranges were established (mean + 3 SD):

- Less than 16 GPS
- Less than 22 MPS

EXPECTED PREVALENCE

SLE:

Serum samples from 53 individuals with SLE were tested with the kit. Seventeen of the samples (32%) were positive for IgG anti-phosphatidylserine antibodies. Four of the samples (8%) were positive for IgM anti-phosphatidylserine antibodies. A good correlation ($r = 0.87$) was found between anti-phosphatidylserine and anti-cardiolipin antibody levels in this group.

Other Disease States:

Twenty-seven serum samples from patients with rheumatoid arthritis (RA) were tested in the assay. Only one sample was positive for IgG anti-phosphatidylserine antibodies. None were positive for IgM anti-phosphatidylserine antibodies.

The clinical significance of positive results in disease states, other than SLE, is still under investigation.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Normal Samples:

Multiple healthy blood donor populations were evaluated against an IgG cut-off of 16 GPS and IgM cut-off of 22 MPS. When the results were averaged, the assay was shown to be 96% specific for IgG aPS antibodies, and 96% specific for IgM aPS antibodies.

Disease Controls:

Serum samples from 10 patients with SLE or a lupus-like disorder who were known not to have had thrombotic episodes, nor any other feature of the anti-phospholipid syndrome, were tested in the assay. None of the samples were positive for IgG anti-phosphatidylserine antibodies (100%). One sample was weakly positive for IgM anti-phosphatidylserine antibodies (90%).

Clinical Sensitivity

Serum samples from 18 female SLE patients with a clinical history of thrombosis, thrombocytopenia or recurrent fetal loss were evaluated for anti-phosphatidylserine antibodies. Nine of the samples were positive for IgG anti-phosphatidylserine antibodies, for a sensitivity of 50% in this sample population. Two of the samples were positive for IgM anti-phosphatidyl-serine antibodies. Seven of the samples had elevated levels of IgG anti-phosphatidylserine antibodies only, two samples had elevated levels of both IgG and IgM anti-phosphatidylserine antibodies, and none were positive for IgM antiphosphatidylserine antibodies only. As described above, serum samples from 10 SLE patients with no clinical history of thrombosis, thrombocytopenia or recurrent fetal loss were used as controls. None of these samples tested positive for IgG anti-phosphatidylserine antibodies. One sample tested positive for IgM anti-phosphatidylserine antibodies.

Precision

Three samples with known GPS values (two low and one high), and three samples with known MPS values (two low and one high) were assayed in 23 replicates on three different occasions. The mean intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) are presented in the following table. The reported intraassay coefficient of variation is the mean of the three separate intraassay CVs. Interassay CV is the coefficient of variation obtained from three plates from one lot.

<u>Sample Value</u>	<u>Intraassay CV</u>	<u>Mean Interassay CV</u>
Low (<10 GPS)	14.9%	8.3%
Low (<10 MPS)	10.7%	7.0%
Low (15 GPS)	9.3%	9.3%
Low (15 MPS)	9.4%	4.8%
High (40 GPS)	14.2%	6.9%
High (40 MPS)	10.3%	5.0%

Recovery

Three samples with known GPS concentration values were mixed in various proportions. The calculated value was compared to the observed value. The observed value divided by the calculated value is given as a percent recovery and is presented in the following table.

<u>Sample Value</u>	<u>Recovery Value(%)</u>
< 10 GPS	78%
~ 30 GPS	91%
~ 40 GPS	98%

Three samples with known MPS concentration values were mixed in various proportions. The calculated value was compared to the observed value. The observed value divided by the calculated value is given as a percent recovery and is presented in the following table.

<u>Sample Value</u>	<u>Recovery Value(%)</u>
< 10 MPS	103%
~ 30 MPS	107%
~ 45 MPS	96%

LIMITATIONS OF THE TEST

The anti-phosphatidylserine antibody concentration values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings and other diagnostic procedures. If clinical findings suggest the presence of anti-phospholipid antibodies and the patient is negative for anti-phosphatidyl-serine antibodies, some investigators recommend testing for anti-cardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant to confirm the negative result. A patient is considered positive for anti-phospholipid antibodies if one or all of the tests give positive results.

Anti-phosphatidylserine antibodies can appear transiently at low levels during many infections.^{18,19} If a patient first tests positive while there are clinical signs of infection, the test should be repeated after an interval of six to eight weeks.

WARRANTY

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

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

READS
ANTI-PHOSPHATIDYLSERINE IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST KIT

In-vitro-Diagnostikum

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur Bestimmung von IgG- und IgM-Anti-Phosphatidylserin-Antikörpern in Humanserum und Zitratplasma (3,2% Natriumzitat).

ANWENDUNGSGEBIET

Nachweis und semiquantitative Bestimmung von Anti-Phosphatidylserin-Antikörpern bei Personen mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) oder lupusartigen Erkrankungen (Antiphospholipid-Syndrom).

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. Die Konzentration der IgG-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper und der IgM-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper muss separat bestimmt werden. Verdünnte Serum- oder Plasmaproben, Kalibratoren und Kontrollen werden in Mikrovertiefungen, die mit Phosphatidylserin beschichtet sind, inkubiert. β_2 -Glykoprotein I wird in einem Probenverdünner geliefert. Die Inkubation ermöglicht eine Reaktion zwischen den Anti-Phosphatidylserin-(aPS)-Antikörpern in der Probe und dem immobilisierten Antigen. Nach dem Auswaschen von ungebundenen Serum- oder Plasmaproteinen werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, für menschliches IgG oder IgM spezifische Antikörper zugefügt, die sodann einen Komplex mit den an Phosphatidylserin gebundenen Antikörpern eingehen. Der Kit enthält zwei enzymkonjugierte Antikörperlösungen, eine für Human-IgG-Antikörper und eine zweite für Human-IgM-Antikörper spezifische Lösung. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid enthält, (H_2O_2) angefärbt. Die Farbe entsteht in den Vertiefungen, wobei die Intensität proportional zur Anti-Phosphatidylserin-Antikörper-Serum-Konzentration ist.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bzw. Extinktion in allen Vertiefungen mit einem Spektrophotometer. Die IgG- und IgM-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper-Konzentrationen in den Kalibratorseren werden in GPS-(IgG-Anti-Phosphatidylserin)- oder MPS-(IgM-Anti-Phosphatidylserin)-Einheiten ausgedrückt. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Vierpunkt-Kalibrationskurve verwenden. Für die Einpunktkalibration wird die Konzentration der Kalibratorseren durch die optische Dichte (OD) des Kalibrators dividiert und ein Umrechnungsfaktor erhalten (je ein Faktor für IgG und IgM). Die OD-Werte der anderen Proben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die IgG- und IgM-Anti-Phosphatidylserin-Antikörperkonzentration in GPS- bzw. MPS-Einheiten zu erhalten. Zur Mehrpunktkalibration wird eine lineare Regressionsanalyse mit Kalibratorwerten gegen die Kalibrator-OD-Werte durchgeführt. Die Ergebnisse für Kontrollen und Patientenproben werden mit Hilfe der Kalibrationskurve bestimmt. Referenzpräparate, bei denen diese Einheiten verwendet werden, befinden sich im Louisville Antiphospholipid Laboratory.

REAGENZIEN

Bei 2-8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Antiphosphatidylserin-Testkit (für insgesamt 96 Vertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien (**die Volumina sind je nach Kitgröße und -konfiguration unterschiedlich**):

- 12x8 mit Phosphatidylserin (aus Schweinehirn) beschichtete Vertiefungen, mit Halterung. (aPS IgG/IgM 12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml Probenverdünner I (grüne Lösung); enthält Kälberserum.* (Sample Diluent I)
- 0,250 ml humane IgG-Kalibratorseren* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); die Antikörperkonzentration ist in GPS-Einheiten auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden. (aPS IgG Calibrator 1, aPS IgG Calibrator 2, aPS IgG Calibrator 3)
- 0,250 ml humane IgM-Kalibratorseren* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); die Antikörperkonzentration ist in MPS-Einheiten auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden. (aPS IgM Calibrator 1, aPS IgM Calibrator 2, aPS IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml humanes IgG-Serum für die positive Kontrolle*; der erwartete GPS-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. (aPS IgG Positive Control)
- 0,250 ml humanes IgM-Serum für die positive Kontrolle*; der erwartete MPS-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. (aPS IgM Positive Control)
- 0,250 ml normales Human-Kontrollserum*; der erwartete GPS- und MPS-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. (aPS IgG/IgM Normal Control)
- 15 ml Anti-human-IgG-Ziegen-Antikörper-Lösung, HRP-konjugiert (blaue Lösung); enthält 0,01% Thimerosal und Gentamycinsulfat als Konservierungsmittel. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml Anti-human-IgM-Ziegen-Antikörper-Lösung, HRP-konjugiert (rote Lösung); enthält 0,01% Thimerosal und Gentamycinsulfat als Konservierungsmittel. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml Einkomponenten-Substrat (TMB/ H₂O₂); gebrauchsfertig. (Substrate TMB/H₂O₂)
- 15 ml Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure). (Stopping Solution 0.36N sulfuric acid)
- 2 Fläschchen (30 ml) Waschkonzentrat (33X PBS). (Wash Concentrate 33X PBS)

***ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung der Kalibratoren und Kontrollen in diesem Kit verwendete Materialien humanen Ursprungs wurden mit FDA-vorgeschriebenen Tests auf Antikörper gegen HBsAg, HCV und HIV 1 und 2 geprüft. Die Ergebnisse waren negativ. Trotzdem sollten alle humanen Blutprodukte einschließlich Patientenproben als potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Bestimmte Bestandteile dieses Produkts enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Azidhaltige Lösungen müssen beim Ausgießen in den Abfluss mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in den Wasserrohren zu vermeiden.

6. Das Einkomponenten-Substrat kann eine Irritation der Augen und der Haut 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:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46).

 Reizend. Risque biologique .

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Serum ist die bevorzugte Probenmatrix. Nach der Probenentnahme durch Venenpunktion sollte das Serum von den Zellen durch Zentrifugation getrennt werden, sobald das Blut geronnen ist. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2-8°C aufzubewahren. Wenn die Proben länger als 72 Stunden nicht analysiert werden, sind sie bei -20°C oder darunter aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Hämolyisiertes, ikterisches oder lipämisches Serum oder Plasma darf nicht verwendet werden, da dies die Ergebnisse verfälschen kann. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, sollten vor dem Test durch Zentrifugation geklärt werden.

In Gegenwart von 3,2% Natriumzitrat gewonnenes Plasma kann verwendet werden. Blut sollte durch Venenpunktion abgenommen und das Plasma sofort durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500g von den Zellen getrennt werden. Der Überstand muss nach dem Zentrifugieren sorgfältig entfernt werden, um eine Kontamination mit Blutplättchen zu vermeiden. Wiederholtes Zentrifugieren und Separieren kann eine Blutplättchenkontamination minimieren. Lysierte oder zu lange gelagerte Blutplättchen können mit Antiphospholipid-Antikörpern reagieren und zu falschen Resultaten führen. Werden die Plasmaproben nicht sofort analysiert, sind sie wie für Serum beschrieben zu lagern.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien

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

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der PBS-Waschlösung und zum Nullabgleich des Platten-Lesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten zur Abgabe von Volumen zwischen 5 und 1000 µl mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Behälter oder Flache, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit etwas zurückgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten, mit dem die Extinktion bei 450 nm bestimmt werden kann (vorzugsweise mit einer 650-nm-Referenz, falls verfügbar)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können

Hinweise zur Durchführung

1. Serumproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18-26 °C) bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen **-nicht aufschäumen**. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren dürfen erst kurz vor dem Bestimmungsansatz verdünnt werden.

3. Für jeden Testlauf kann auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. In diese Vertiefung dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden dieser Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser hinzugefügt. Das Plattenlesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Waschlösung in der für den Substratleerwert reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. WICHTIG: Wenn überschüssiges PBS 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. Eine exakte Zeitkontrolle bei allen Testschritten ist wichtig. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von Minuten zugefügt werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit dem Ende der Reagenzien- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der Raumtemperatur (18-26 °C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der Fläschchen und Entfernen aliquoter Teile sollte eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Kein Tween 20 oder andere oberflächenaktive Stoffe bei diesem Test verwenden.
13. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
14. Die Komponenten verschiedener Kit-Chargen nicht mischen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschlösung (PBS): 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS) abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 Liter verdünnen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete PBS-Lösung im Kühlschrank bei 2-8 °C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1. Der Test kann mit Einpunktkalibration (Kalibrator 2) oder einer Vierpunkt-Kalibrationskurve (Kalibratoren 1, 2 und 3 plus Probenverdünner/Blindversuch als Kalibrator 4 mit 0 GPS oder 0 MPS Einheiten) durchgeführt werden. Auch für IgG- und IgM-Konjugat sollte jeweils eine Vertiefung als Blindversuch unter Verwendung der Einpunkt- und Mehrpunktkalibration dienen. Der Vertiefung wird Probenverdünner ohne Serum zugesetzt. Diese Vertiefung wird im weiteren Testablauf wie eine Probenvertiefung behandelt.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und im bereitgestellten Säckchen aufbewahren.
3. Eine 1:50 Verdünnung der Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Probenverdünner (grüne Lösung) herstellen; Beispiel: 10 µl Probe zu 490 µl Probenverdünner I ergibt eine 1:50 Probenverdünnung.
4. 100 µl der verdünnten Kalibratoren (einschließlich Blindversuch/Kalibrator 4), Kontrollen und Patientenprobe(n) den jeweiligen Vertiefungen beifügen.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Vertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Vertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.

6. Viermal mit PBS waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschvorgang mit PBS gefüllt werden. Nach jedem Waschschritt wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Vertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Der Streifenhalter muss in der Mitte, oben und unten zusammengedrückt werden, um ein Herausfallen der Vertiefungsmodule beim Waschen zu vermeiden. Auf saugfähigem Papier abtupfen, um die Waschlösung restlos zu entfernen. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Waschschritten nicht austrocknen.
7. 100 µl Anti-Human-IgG-Konjugat (blau) in die jeweiligen Vertiefungen, die für den IgG-Kalibrator, Kontrollen, Blindversuch und Patientenproben vorgesehen sind, pipettieren. 100 µl Anti-Human-IgM-Konjugat in die Vertiefungen, die für den IgG-Kalibrator, Kontrollen, Blindversuch und Patientenproben vorgesehen sind, pipettieren.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation werden die Konjugatlösungen durch vorsichtiges Umdrehen der Vertiefungen entleert. Darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der IgG- und IgM-Antikörper-Konjugat-Lösungen kommt.
9. Viermal wie in Schritt 6 beschrieben mit PBS waschen. Nach dem letzten Waschvorgang durch rasche Bewegungen die Flüssigkeit abfließen lassen und auf saugfähigem Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
10. Jeder Vertiefung 100 µl Substrat zugeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung beendet. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während die bisher farblos gebliebene Lösung weiterhin farblos bleibt. Das Plattenlesegerät gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung nullabgleichen. Die optische Dichte (OD) aller Vertiefungen bei 450 nm ablesen (und bei 650 nm als Referenzwellenlänge bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers). Die OD-Werte sollten innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmt werden.

Ergebnisse Einpunktkalibration

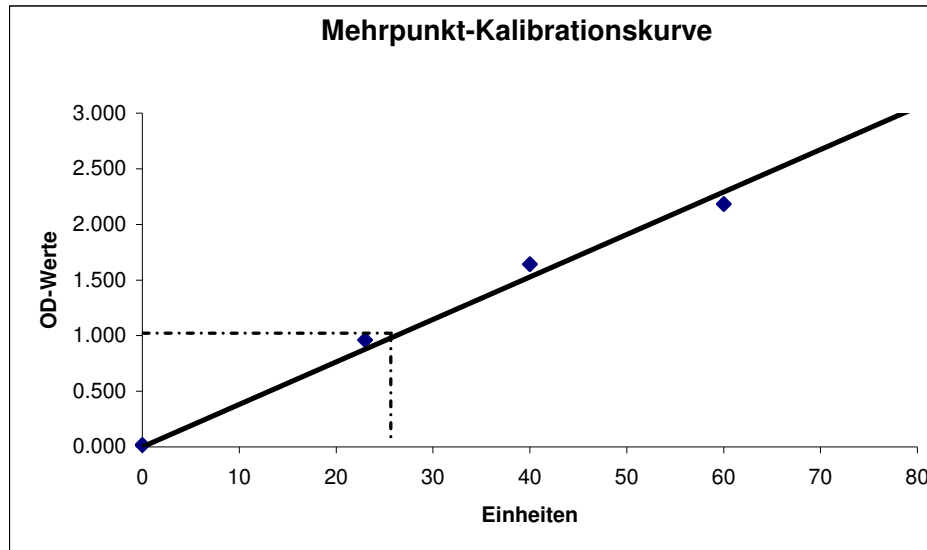
1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibrator 2, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Zur Berechnung des Umrechnungsfaktors die Konzentration von Kalibrator 2 (auf Fläschchenetikett angegeben) durch den OD-Wert bzw. OD-Mittelwert des Kalibratorserums dividieren.
3. Den OD-Wert bzw. OD-Mittelwert jeder Kontrolle und jeder Patientenprobe mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multiplizieren, um den Konzentrationswert in GPS- bzw. MPS-Einheiten zu erhalten.

<p>Umrechnungsfaktor =</p> $\frac{\text{Anti-Phosphatidylserin-Konzentration von Kalibrator 2 (GPS oder MPS)}}{\text{Extinktionswert von Kalibrator 2 (OD - G oder M)}}$ <p>Anti-Phosphatidylserin-Konzentration der Probe =</p> $\text{Umrechnungsfaktor X Extinktion der Probe (OD)}$

4. Der Umrechnungsfaktor muss für beide Kalibratoren für jeden Testlauf berechnet werden. Die Verwendung von Umrechnungsfaktoren früherer Testansätze und das Verwechseln von GPS- und MPS-Umrechnungsfaktoren führt zu falschen Ergebnissen.

Kalibration über Mehrpunktkurve

1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Mit den vier Kalibratorwerten (die GPS- bzw. MPS-Einheiten sind auf den Fläschchenetiketten angegeben; Kalibrator 4 (Probenverdünner) entspricht 0 GPS- bzw. MPS-Einheiten) eine lineare 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. Um negative Werte zu vermeiden, sollte beim Erstellen der Regressionskurve ein Achsenabschnitt von Null verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollten etwaige negative Werte als Null angegeben werden. Bei manueller Erstellung der Kurve muss eine Ausgleichsgerade mit Achsenabschnitt Null durch die aufgetragenen Punkte gezogen werden.
4. Mit Hilfe der Kalibrationskurve die Werte für Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
5. Beispiel für eine Mehrpunkt-Kalibrationskurve.



In der als Beispiel verwendeten Kalibrationskurve entspräche eine OD der Probe von 1,000 bei 450 nm einem berechneten Wert von 26,2 Einheiten. Diese Kalibrationskurve dient nur Illustrationszwecken und darf nicht für die Berechnung von Patientenwerten verwendet werden. Zu jedem Testlauf sollte eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.

Qualitätskontrolle

1. Um die Zuverlässigkeit des Kits zu bestätigen, sollte der OD-Wert von Kalibrator 2 mindestens 0,600 betragen. OD-Werte von weniger als 0,600 für Kalibrator 2 können darauf hinweisen, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Der OD-Wert für Kalibrator 4 oder Blindversuch sollte unter 0,100 liegen, wenn das Spektrophotometer gegen Luft oder eine mit Wasser gefüllte Vertiefung auf Null gestellt wurde. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollseren erhaltenen Anti-Phosphatidylserinwerte müssen mit dem auf der Flasche angegebenen Sollbereich übereinstimmen. 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 Grenzwerte für die jeweilige Patientenpopulation festlegen. Siehe *Performance Characteristics, Clinical Specificity* als Beispiel.
6. Proben mit Anti-Phosphatidylserin-Werten über 100 GPS oder 80 MPS können als „über 100 GPS oder 80 MPS“ bewertet werden.
7. Bevor die Analyseergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Abschnitt Qualitätskontrolle).

NORMALBEREICH

Serumproben von 130 gesunden Blutspendern wurden auf IgG-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper und 128 Proben auf IgM-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper getestet. Folgende Normalwerte wurden festgesetzt (Durchschnitt + 3 SD):

- Weniger als 16 GPS
- Weniger als 22 MPS

ALLGEMEINE GÜLTIGKEIT:

SLE:

Seren von 53 Patienten mit SLE wurden mit dem Testkit überprüft. 17 der Proben (32%) waren auf IgG-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper positiv. 4 Proben (8%) waren auf IgM-Antiphosphatidylserin-Antikörper positiv. In dieser Gruppe wurde eine gute Korrelation ($r = 0,87$) zwischen Antiphosphatidylserin- und Anti-Kardiolipin-Antikörperspiegeln gefunden.

Andere Krankheiten:

27 Serumproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) wurden mit dem Test geprüft. Nur eine Probe reagierte auf IgG-Anti-Phosphatidylserin-Antikörper positiv. Keine der Proben reagierte auf IgM-Phosphatidylserin-Antikörper positiv.

Die klinische Signifikanz positiver Ergebnisse bei verschiedenen Krankheiten (mit Ausnahme von SLE) wird derzeit noch untersucht.

GRENZEN DES TESTS

Die Anti-Phosphatidylserin-Antikörperkonzentrationen, die mit diesem Test erhalten werden, sind lediglich als Hilfsmittel bei der Diagnosestellung anzusehen. Jeder Arzt muss diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten, der körperlichen Untersuchung sowie den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretieren. Falls klinische Befunde das Vorhandensein von Anti-Phospholipid-Antikörpern vermuten lassen, und das Patientenserum negativ auf Anti-Phosphatidylserin-Antikörper reagiert, empfehlen einige Forscher einen Test auf Antikardiolipin-Antikörper und Lupus-Antikoagulans, um das negative Ergebnis zu bestätigen. Ein Patient ist als positiv für Anti-Phospholipid-Antikörper einzustufen, wenn ein oder alle Tests ein positives Resultat ergeben.

Anti-Phosphatidylserin-Antikörper können bei vielen Infektionen in niedriger Konzentration vorübergehend nachgewiesen werden.^{18,19} Hat ein Patient klinische Anzeichen einer Infektion und der erste Test entfällt positiv, sollte er nach sechs bis acht Wochen nochmals getestet werden.

GARANTIE

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

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

REAADS®
ANTI-PHOSPHATIDYLSÉRINE IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST KIT

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

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

UTILISATION

Détection et semi-quantification des anticorps anti-phosphatidylsérine chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et de troubles de type lupique (syndrome des anti-phospholipides).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. La concentration des anticorps IgG anti-phosphatidylsérine et celle des anticorps IgM anti-phosphatidylsérine doivent être déterminées séparément. Les micropuits enduits de phosphatidylsérine sont incubés avec les échantillons de sérum ou de plasma, les sérums étalons et les contrôles dilués. β_2 -glycoprotéine I est fournie dans le tampon pour échantillon. L'incubation permet aux anticorps antiphosphatidylsérine (aPS) présents dans les échantillons de réagir avec l'antigène immobilisé. Après élimination par lavage des protéines du sérum ou du plasma non liées, les anticorps spécifiques pour l'IgG ou IgM humaine marqués à la peroxydase du raifort (PR) sont ajoutés et forment des complexes avec les anticorps liés de la phosphatidylsérine. Deux solutions d'anticorps conjugués à des enzymes, respectivement spécifiques pour les anticorps IgG humaine et pour les anticorps IgM humaine, sont fournies. Après un deuxième lavage, le conjugué est révélé par addition d'une unique solution contenant du tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à titre de substrat chromogène. L'intensité de la couleur développée dans les puits est proportionnelle à la concentration des anticorps anti-phosphatidylsérine (aPS) du sérum.

Le résultat s'obtient par lecture de la D.O. (densité optique ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Des sérums étalons sont fournis, les concentrations d'anticorps IgG et IgM anti-phosphatidylsérine étant respectivement exprimées en unités GPS (IgG anti-phosphatidylsérine) ou MPS (IgM anti-phosphatidylsérine). L'utilisateur peut choisir d'utiliser un étalonnage à point unique ou une courbe d'étalonnage à quatre points. Dans le cas d'un étalonnage à point unique, le facteur de conversion (un pour IgG et un pour IgM) s'obtient en divisant la valeur de la concentration de l'étalon par sa D.O. Les valeurs de D.O. des autres échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir les concentrations des anticorps IgG et IgM anti-phosphatidylsérine en unités GPS ou MPS. Dans le cas d'un étalonnage multipoint, effectuer l'analyse par régression linéaire des valeurs de l'étalon comparées aux D.O. de l'étalon. Les résultats des contrôles et des échantillons patient se déterminent à partir de la courbe d'étalonnage. Ces unités peuvent être tracées jusqu'aux préparations de référence du Louisville Antiphospholipid Laboratory.

RÉACTIFS

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

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

- 12 x 8 micropuits enduits de phosphatidylsérine (provenant de cerveau porcin), avec cadre. (aPS IgG/IgM 12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml de tampon I pour échantillon (solution verte) ; contient du sérum de veau.* (Sample Diluent I)
- 0,250 mL de sérum IgG (humain) étalon* (1-élevé, 2-modéré, 3-bas) ; voir les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités GPS. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique. (aPS IgG Calibrator 1, aPS IgG Calibrator 2, aPS IgG Calibrator 3)
- 0,250 ml de sérum IgM (humain) étalon* (1-élevé, 2-modéré, 3-bas) ; voir les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités MPS. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique. (aPS IgM Calibrator 1, aPS IgM Calibrator 2, aPS IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml de sérum IgG positif de contrôle* (humain) ; voir l'étiquette du flacon pour la plage GPS prévue. (aPS IgG Positive Control)
- 0,250 ml de sérum IgM positif de contrôle* (humaine) ; voir l'étiquette du flacon pour la plage MPS prévue. (aPS IgM Positive Control)
- 0,250 ml de sérum normal de contrôle* (humain) ; voir l'étiquette du flacon pour les plages GPS et MPS prévues. (aPS IgG/IgM Normal Control)
- 15 ml de conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaine/PR (solution bleue) ; contient 0,01 % de sulfate de thimérosal et de gentamycine à titre d'agent conservateur (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de conjugué anticorps de chèvre anti-IgM humaine/PR (solution rouge) ; contient 0,01 % de sulfate de thimérosal et de gentamycine à titre d'agent conservateur. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de substrat à un composant (TMB et H₂O₂) ; prêt à l'emploi. (Substrate TMB/H₂O₂)
- 15 ml de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N). (Stopping Solution 0.36N sulfuric acid)
- 2 bouteilles (30 ml) de concentré de lavage (33x SPTP). (Wash Concentrate 33X PBS)

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

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

1. Les sérums humains utilisés pour préparer les étalons et les contrôles inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAg, anti-HCV et anti-HIV 1 & 2 selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons des patients, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants de ce produit contiennent de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.

6. Le substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption à travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources de chaleur. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
7. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Irritant . Biologisches Risiko .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Réaliser les dosages sur sérum de préférence. Effectuer la ponction veineuse sur tube sec ; centrifuger après la formation du caillot. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20 °C ou moins. Éviter de décongeler/recongeler. De même, ne pas utiliser des plasmas ou des sérums hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester. Les plasmas prélevés avec 3,2 % de citrate de sodium peuvent être utilisés. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le plasma immédiatement séparé des cellules par centrifugation à 1 500 g pendant 10 minutes. Pour cela, séparer soigneusement le plasma des cellules après la centrifugation, afin d'éviter la contamination par les plaquettes. Répéter l'opération si nécessaire. Des plaquettes lysées ou anciennes peuvent réagir avec les anticorps antiphospholipides et entraîner des résultats aberrants. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons de plasma doivent être stockés de la manière décrite pour le sérum.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni

Kit de test d'anti-phosphatidylsérine REAADS ; voir « Réactifs » pour la liste complète.

Matériel requis mais non fourni

- Eau pure pour analyse pour préparer la solution mère SPTP et pour mettre à zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 µl et 1 000 µl, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- 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 l'absorbance à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanal capables d'alimenter 8 puits simultanément

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de sérum et les réactifs à température ambiante (18 à 26 °C) et bien mélanger avant l'utilisation, **éviter la formation de mousse**. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur.
2. Diluer les étalons, les contrôles et les tests de sérum ou de plasma extemporanément.
3. Un puits d'eau à blanc peut être installé sur chaque plaque pour chaque série. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être mis à zéro ou « à vide » sur l'air ou sur un puits d'eau.

4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. L'utilisation de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de plaque de microtitrage.
5. **IMPORTANT** : L'élimination imparfaite des résidus SPTP risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de d'alimenter 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 5 minutes tous les étalons, contrôles et échantillons. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Toutes les étapes d'incubation commencent au moment de l'addition du réactif ou de l'échantillon.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26 °C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser de Tween 20 ou d'autres détergents dans ce dosage.
13. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
14. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de lots différents.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Solution mère (SPTP) : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (SPTP 33x) 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 inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Le dosage peut être effectué avec un étalonnage à point unique (étalon 2) ou une courbe d'étalonnage à quatre points (étalon 1, 2 et 3 plus tampon d'échantillon/réactif à blanc à titre d'étalon 4 égal à 0 unité GPS ou MPS). Un réactif à blanc de contrôle doit aussi être analysé pour chaque conjugué IgG et IgM, avec la méthode d'étalonnage aussi bien à point unique que multipoint ; du diluant d'échantillon sans sérum est déposé dans le puits. Ce puits sera traité de la même manière que les puits échantillon dans les étapes suivantes du dosage.
2. Retirer toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Diluer les échantillons, les étalons et les contrôles au 1/50e dans le tampon pour échantillon (solution verte). Exemple : 10 µl d'échantillon et 490 µl de tampon pour échantillon I égale une dilution d'échantillon au 1/50e.
4. Ajouter 100 µl d'étalon (y compris le réactif à blanc/étalon 4), de contrôles et d'échantillon(s) patient dilués aux micropuits appropriés.
5. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et vider le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
6. Laver 4 fois au SPTP. Chaque puits doit être rempli de SPTP à chaque lavage. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Tenir le cadre serré par le milieu de ses bords supérieur et inférieur 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 anti-humain IgG (bleu) aux puits correspondant aux étalons IgG, contrôles, réactif à blanc et échantillons patient. Ajouter 100 µl de conjugué anti-humain IgM (rouge) aux puits correspondants aux étalons IgM, contrôles, réactif à blanc et échantillons patient.
8. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et vider les solutions conjuguées. Veiller à empêcher toute contamination croisée des solutions conjuguées d'anticorps IgG et IgM.

9. Laver 4 fois au SPTP ainsi que 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 solution substrat dans chaque puits et laisser incubé 10 minutes à température ambiante. Ajouter la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
11. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. 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 incolore reste incolore. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur puits d'eau ou d'air à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm (et à la référence 650 nm si à double faisceau). La D.O. doit être mesurée dans les 5 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

RÉSULTATS

Étalonnage à point unique

1. Calculer les D.O. moyennes si l'étalon 2, les contrôles et les échantillons patient ont été traités en double.
2. Pour calculer le facteur de conversion, diviser la concentration de l'étalon 2 imprimée sur l'étiquette du flacon par la D.O. ou la D.O. moyenne obtenue pour ce sérum étalon.
3. Multiplier la D.O. ou la D.O. moyenne de chacun des contrôles et des échantillons patient par le facteur de conversion approprié pour obtenir les concentrations en unités GPS ou MPS.

$$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Concentration en anti-phosphatidylsérine de l'étalon 2 (unités GPS/MPS)}}{\text{Valeur d'absorbance de l'étalon 2 (D.O. - G ou M)}}$$

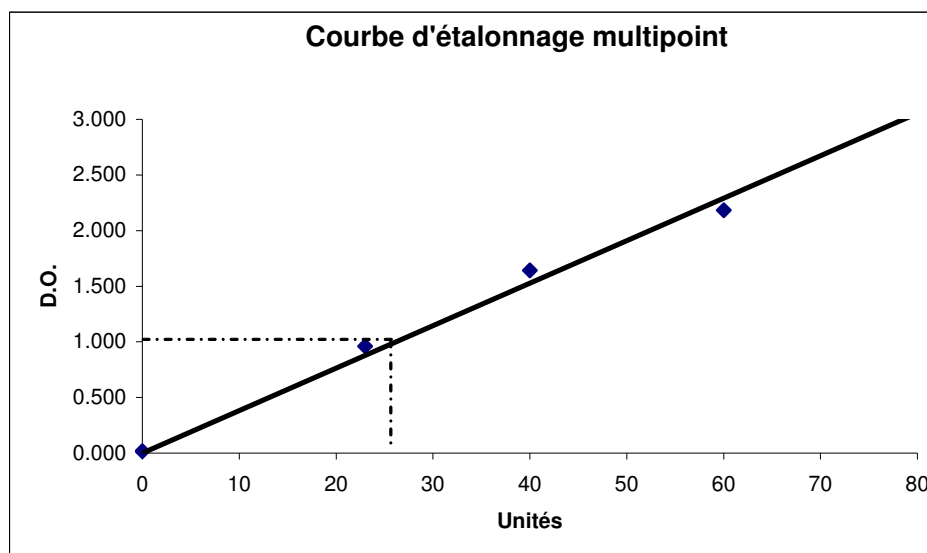
$$\text{Concentration en anti-phosphatidylsérine de l'échantillon} = \text{Facteur de conversion} \times \text{l'absorbance de l'échantillon (D.O.)}$$

4. Le facteur de conversion doit être calculé pour chacun des étalons à chaque série. Utiliser un facteur de conversion d'une autre série ou intervertir les facteurs de conversion MPS ou GPS invaliderait les résultats.

Étalonnage par courbe multipoint

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

5. Exemple de courbe d'étalonnage multipoint.



Selon la courbe d'étalonnage donnée en exemple, une D.O. d'échantillon de 1 000 à 450 nm correspondrait à une valeur calculée de 26,2 unités. La courbe d'étalonnage n'est donnée qu'à titre d'exemple et ne doit pas être utilisée pour calculer des résultats de patients. Effectuer une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque lot de tests.

Contrôle qualité

1. La D.O. de l'étalon 2 doit être d'au moins 0,600 pour valider le bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,600 indique que le kit est périmé.
2. La D.O. obtenue pour l'étalon 4, réactif à blanc, doit être inférieure à 0,100 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur un puits d'air ou d'eau. Une valeur supérieure à 0,100 indique une contamination.
3. Les valeurs en antiphosphatidylsérine obtenues pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette indiquée sur les flacons. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Les valeurs de densité optique (si effectué) pour les doubles des contrôles ou des échantillons patient 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 valeurs seuil normales de la population de patients appropriée. (Voir le chapitre *Performance Characteristics, Clinical Specificity* à titre d'exemple.)
6. Les échantillons dont les valeurs de phosphatidylsérine sont supérieures à 100 GPS ou 80 MPS peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 100 GPS ou 80 MPS ».
7. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

PLAGE NORMALE

130 sérums provenant de donneurs de sang sains ont été testés pour les anticorps IgG antiphosphatidylsérine et 128 pour les anticorps IgM antiphosphatidylsérine (aPS) ; les plages suivantes ont été établies (moyenne + 3 DS) :

- Inférieure à 16 GPS
- Inférieure à 22 MPS

PRÉVALENCE ATTENDUE

LES :

53 sérums provenant de patients avec LES ont été testés à l'aide du kit. Dix-sept des sérums (32 %) étaient positifs pour les anticorps IgG antiphosphatidylsérine. Quatre des sérums (8 %) étaient positifs pour les anticorps IgM antiphosphatidylsérine. Une bonne corrélation ($r = 0,87$) a été trouvée dans ce groupe entre les niveaux d'anticorps antiphosphatidylsérine et anti-cardiolipine.

Autres maladies :

Vingt-sept sérums provenant de patients avec arthrite rhumatoïde (AR) ont été testés avec le kit. Un seul sérum était positif pour les anticorps IgG antiphosphatidylsérine. Aucun résultat positif pour les anticorps IgM antiphosphatidylsérine.

La signification clinique des résultats positifs en cas de maladie autre que le LES est toujours en cours d'investigation.

LIMITES DU TEST

Les valeurs obtenues d'anticorps antiphosphatidylsérine constituent seulement une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Si le contexte clinique suggère la présence d'anticorps antiphospholipides et que le patient est négatif pour les anticorps antiphosphatidylsérine, certains auteurs recommandent le dosage des anticorps anti-cardiolipine et des anticoagulants lupiques circulants pour confirmer le résultat négatif. Si l'un ou la totalité des tests pour un patient est positive, la présence d'anticorps antiphospholipides est confirmée.

Les anticorps antiphosphatidylsérine apparaissent de façon faible et transitoire dans beaucoup d'infections.^{18,19} Si le test d'un patient est d'abord positif alors qu'il présente des signes d'infection, le test doit être renouvelé après 6 à 8 semaines.

GARANTIE

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

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

READS®
ANTI-PHOSPHATIDYLSERINE IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST KIT

Para uso diagnóstico *in vitro*

Un enzimoimmunoensayo (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG e IgM antifosfatidilserina en suero o plasma citratado (citrato de sodio al 3,2%) humanos.

INDICACIONES

Detección y semicuantificación de anticuerpos antifosfatidilserina en individuos con lupus eritematoso diseminado (LED) y enfermedades similares al lupus (síndrome antifosfolipídico).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. La concentración de los anticuerpos antifosfatidilserina IgG y la de los anticuerpos antifosfatidilserina IgM deben determinarse por separado. Las muestras diluidas de suero o plasma, los sueros calibradores y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de fosfatidilserina. β_2 -glucoproteína I está incorporada en el diluyente de muestras. La incubación permite que los anticuerpos antifosfatidilserina (aPS) presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Después de retirar mediante lavado las proteínas séricas o plasmáticas no unidas, se añaden anticuerpos específicos para IgG o IgM humanas marcados con la enzima peroxidasa (HRP); estos anticuerpos específicos forman complejos con los anticuerpos unidos a la fosfatidilserina. Se suministran dos soluciones de anticuerpos conjugados a enzimas: una específica para anticuerpos IgG humanos y otra específica para anticuerpos IgM humanos. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo una solución de tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H_2O_2) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos antifosfatidilserina (aPS).

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

REACTIVOS

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

Cada equipo de determinación de antifosfatidilserina REAADS de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos (**los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo**):



- 12x8 micropocillos recubiertos de fosfatidilserina (de cerebro porcino), con gradilla. (aPS IgG/IgM 12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml de diluyente de la muestra I (solución verde); contiene suero bovino de ternero*. (Sample Diluent I)
- 0,250 ml de sueros calibradores* de IgG (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humanos); la etiqueta del frasco especifica la concentración de anticuerpos en unidades GPS. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto. (aPS IgG Calibrator 1, aPS IgG Calibrator 2, aPS IgG Calibrator 3)
- 0,250 ml de sueros calibradores* de IgM (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humanos); la etiqueta del frasco especifica la concentración de anticuerpos en unidades MPS. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto. (aPS IgM Calibrator 1, aPS IgM Calibrator 2, aPS IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml de suero IgG humano de control positivo*; el rango GPS esperado se especifica en la etiqueta del frasco. (aPS IgG Positive Control)
- 0,250 ml de suero IgM humano de control positivo*; el rango MPS esperado se especifica en la etiqueta del frasco. (aPS IgM Positive Control)
- 0,250 ml de suero humano de control normal*; los rangos GPS y MPS esperados se especifican en la etiqueta del frasco. (aPS IgG/IgM Normal Control)
- 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgG humana (de cabra) y HRP (solución azul); contiene 0,01% de timerosal y sulfato de gentamicina como conservantes. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP (solución roja); contiene 0,01% de timerosal y sulfato de gentamicina como conservantes. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de sustrato de un componente (TMB y H₂O₂); listo para su uso. (Substrate TMB/H₂O₂)
- 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N). (Stopping Solution 0.36N sulfuric acid)
- 2 envases de 30 ml de concentrado de lavado (tampón fosfato PBS 33x). (Wash Concentrate 33X PBS)

*** 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) y de los VIH 1 y 2 requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables cuando manipule reactivos del kit y lávese minuciosamente las manos después de su uso.
5. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.

6. Un sustrato de un componente puede causar irritación ocular o cutánea. Es posible la absorción a través de la piel. Utilice guantes cuando manipule el 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:
Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).
Irritante . Rischio biologico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El suero es la 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 o plasma hemolizado, icterico o lipémico, ya que puede producir resultados erróneos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

Puede utilizarse plasma obtenido con citrato de sodio al 3,2%. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el plasma debe separarse inmediatamente de las células mediante centrifugación a 1500g durante 10 minutos. El sobrenadante debe extraerse cuidadosamente tras la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas. Se recomienda repetir los pasos de centrifugación y separación para minimizar la contaminación con plaquetas. Los trombocitos disueltos o deteriorados por el tiempo pueden reaccionar con los anticuerpos antifosfolípido y producir resultados erróneos. Si no se van a analizar inmediatamente, las muestras de plasma deben almacenarse como se ha descrito para el caso del suero.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos

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

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua para reactivos para preparar una solución de lavado PBS y para ser usada como cero o testigo durante la lectura de la placa final del análisis
- Cilindros graduados
- Pipetas de precisión capaces de administrar entre 5 y 1000 µl, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o envase de 1 litro
- Envases para lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, con un sistema automático o semiautomático de lavado
- Guantes desechables
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de administrar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero o plasma y los reactivos del equipo alcancen la temperatura ambiente (18-26°C) y mézclelos bien antes de utilizarlos. **Evite la formación de espuma.** Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones de los calibradores, los controles y los sueros o el plasma deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.

3. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo de agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua para reactivos al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o a borrarse con respecto a un pocillo de aire o agua.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión hacia el fondo de los micropocillos apretando una botella de plástico de punta. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado de placas de microvaloración automático.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS, 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 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice Tween 20 ni otros detergentes en este ensayo.
13. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
14. No utilice componentes provenientes de equipos con diferentes números de lote.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Solución de lavado (PBS): Mida 30 ml de concentrado para lavado (PBS 33x) y dilúyalos en agua para reactivos hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución PBS no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. El ensayo puede realizarse con una calibración de un solo punto (calibrador 2) o una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3 más el diluyente de muestras o el reactivo testigo como calibrador 4 igual a 0 unidades GPS o MPS). También se debe realizar un control con reactivo testigo para cada conjugado, IgG e IgM con el método de calibración de un solo punto y con el método multipuntual; se añade diluyente de muestras sin suero al pocillo. Este pocillo se tratará de la misma forma que los pocillos de muestra en los siguientes pasos del ensayo.
2. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
3. Prepare una dilución 1:50 de los calibradores, controles y muestras de pacientes en el diluyente de la muestra (solución color verde); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 490 µl de diluyente de la muestra I es igual a una dilución de muestra de 1:50.
4. Añada 100 µl de calibradores diluidos (incluidos el reactivo testigo y el calibrador 4), controles y muestras de pacientes a los micropocillos correspondientes.
5. Incúbese durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.

6. Lave 4 veces con PBS. Cada pocillo debe llenarse con PBS 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. El marco 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 secante para retirar los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
7. Añada 100 µl de conjugado de anti-IgG humana (azul) a los pocillos correspondientes al calibrador, los controles, el reactivo testigo y las muestras de pacientes de IgG. Añada 100 µl de conjugado de anti-IgM humana (rojo) a los pocillos correspondientes al calibrador, los controles, el reactivo testigo y las muestras de pacientes de IgM.
8. Incúbese durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe las soluciones conjugadas. Tenga cuidado de no permitir la contaminación cruzada de soluciones conjugadas de anticuerpos IgG e IgM.
9. Lave 4 veces con PBS 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 sustrato a cada pocillo e incube durante 10 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 la solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Añada la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y al mismo ritmo con el que se añadió el sustrato. El sustrato azul se volverá amarillo y la solución incolora permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a un pocillo testigo de aire o agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble). Los valores de la D.O. deben 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 duplicados del calibrador 2, los controles y las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero 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 de concentración en unidades GPS o MPS, multiplique la D.O. o la media de la D.O. de cada uno de los controles y de las muestras de pacientes por el factor de conversión apropiado.

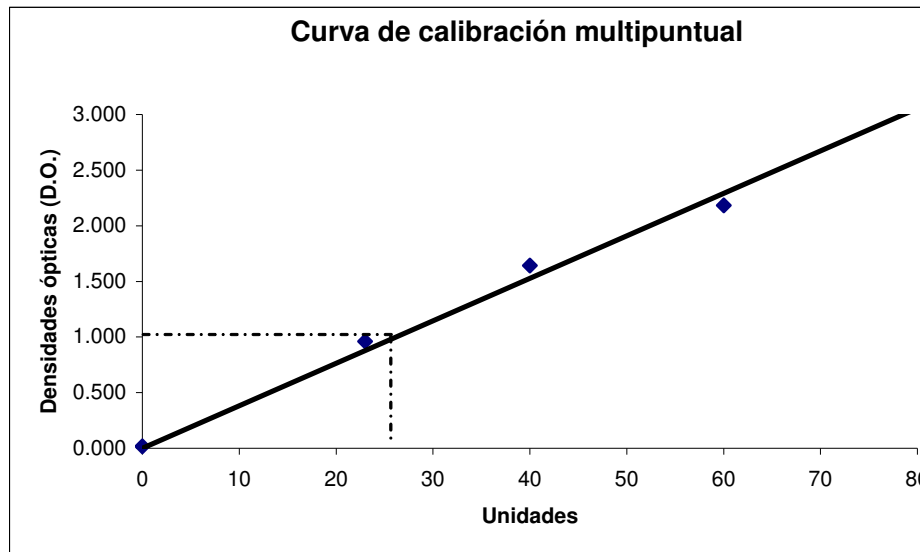
<p>Factor de conversión =</p> $\frac{\text{Concentración de antifosfatidilserina del calibrador 2 (unidades GPS o MPS)}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 2 (D.O. - G o M)}}$ <p>Concentración de antifosfatidilserina de la muestra =</p> $\text{Factor de conversión} \times \text{absorbancia de la muestra (D.O.)}$
--

4. El factor de conversión debe calcularse para los dos calibradores en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo o se intercambian los factores de conversión de GPS o MPS, los resultados obtenidos no serán válidos.

Curva de calibración multipuntual

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión lineal con los valores de los cuatro calibradores (la etiqueta del frasco especifica las unidades GPS y MPS. El calibrador 4 [diluyente de muestras] es igual a 0 unidades GPS o 0 unidades MPS) 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. Para evitar los valores negativos, se recomienda utilizar una intersección en cero al generar la línea de regresión. Si no se dispone de esta opción, los valores negativos se indicarán como ceros. Cuando se genera la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados utilizando una intersección de cero.
4. Determine los valores de la muestra de controles y pacientes obtenidos a partir de la curva del calibrador.
5. Ejemplo de calibración con curva multipuntual.



Usando la curva de calibración suministrada, la D.O. de una muestra de 1,000 a 450 nm correspondería a un valor calculado de 26,2 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo y no debe usarse para calcular los resultados del paciente. Debe realizarse una nueva curva de calibración con cada proceso de prueba.

Control de calidad

1. El valor de D.O. del calibrador 2 debe ser 0,600 como mínimo para garantizar que el equipo funciona adecuadamente. Las lecturas de D.O. del calibrador 2 inferiores a 0,600 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
2. La D.O. del calibrador 4 o del reactivo testigo debe ser inferior a 0,100 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto a aire o a un pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,100 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
3. Los valores de antifosfatidilserina obtenidos con el suero de control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del envase. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Si se procesan duplicados de los controles y las muestras de los pacientes, sus valores de D.O. 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 valores umbral para la población de pacientes correspondiente. Como ejemplo, véase *Performance Characteristics, Clinical Specificity*.
6. Las muestras con valores de antifosfatidilserina de más de 100 GPS u 80 MPS pueden especificarse como «más de 100 GPS u 80 MPS».
7. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase el apartado «Control de calidad») antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

RANGO NORMAL

Tras comprobar las concentraciones de anticuerpos antifosfatidilserina IgG en muestras de suero de 130 donantes de sangre sanos y las de anticuerpos antifosfatidilserina (aPS) IgM en muestras de suero de 128 donantes de sangre sanos, se establecieron los siguientes rangos normales (media + 3 desviaciones estándar):

- Menos de 16 GPS
- Menos de 22 MPS

PREVALENCIA ESPERADA

LED:

Se utilizó el equipo para analizar muestras de suero de 53 pacientes con LED. Diecisiete de las muestras (32%) dieron positivo en anticuerpos antifosfatidilserina IgG. Cuatro de las muestras (8%) dieron positivo en anticuerpos antifosfatidilserina IgM. En este grupo se observó una buena correlación ($r = 0,87$) entre las concentraciones de anticuerpos antifosfatidilserina y anticardiolipina.

Otros estados patológicos:

Se analizaron 27 muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide (AR). Sólo una muestra dio positiva en anticuerpos antifosfatidilserina IgG. Ninguna muestra dio positiva en anticuerpos antifosfatidilserina IgM.

La importancia clínica de los resultados positivos en estados patológicos distintos del LED aún está investigándose.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos antifosfatidilserina obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. 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. Si los datos clínicos indican la presencia de anticuerpos antifosfolípido y el paciente resulta negativo en anticuerpos antifosfatidilserina, algunos investigadores recomiendan analizar la presencia de anticuerpos anticardiolipina y del anticoagulante lúpico para confirmar el resultado negativo. Un paciente se considera positivo en anticuerpos antifosfolípido si se obtienen resultados positivos en una o en todas las pruebas.

Los anticuerpos antifosfatidilserina pueden aparecer transitoriamente a niveles bajos durante un gran número de infecciones^{18,19}. Si la primera prueba de un paciente es positiva cuando existen signos clínicos de infección, la prueba deberá repetirse después de un intervalo de seis a ocho semanas.

GARANTÍA

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

Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al 1-800-729-5661. Fuera de los EE.UU., llame al (303)-457-4345, envíe un fax al (303)-457-4519 o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

**READS®
ANTI-PHOSPHATIDYLSERINE IgG/IgM SEMI-QUANTITATIVE TEST KIT**

Per uso diagnostico *in vitro*

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

USO PREVISTO

L'individuazione e la determinazione semiquantitativa di anticorpi anti-fosfatidilserina nei soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) e da disturbi di tipo lupus (sindrome da antifosfolipidi).

PRINCIPIO DEL TEST

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. Le concentrazioni di anticorpi IgG antifosfatidilserina e di anticorpi IgM anti-fosfatidilserina devono essere determinate separatamente. I campioni diluiti di siero o di plasma, i sieri di calibrazione e i controlli vengono incubati in pozzetti rivestiti di fosfatidilserina. β_2 -glicoproteina I viene fornita nel diluente per campioni. L'incubazione permette agli anticorpi anti-fosfatidilserina (aPS) presenti nei campioni di reagire con l'antigene immobilizzato. Una volta eliminate mediante lavaggio le proteine non legate del siero o del plasma, gli anticorpi specifici per le IgG o IgM umane, marcati con perossidasi di rafano (HRP), vengono aggiunti per formare dei complessi con gli anticorpi legati alla fosfatidilserina. Vengono fornite due soluzioni di anticorpi coniugati ad enzimi: una specifica per gli anticorpi IgG umani e una specifica per gli anticorpi IgM umani. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene dosato mediante aggiunta di una singola soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2) come substrato cromogeno. La colorazione si sviluppa nei pozzetti ad una intensità proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-fosfatidilserina (aPS) nel siero.

I risultati si ottengono leggendo in uno spettrofotometro la densità ottica (o assorbanza) di ciascun pozzetto. I sieri di calibrazione vengono forniti con le concentrazioni di anticorpi IgG e IgM anti-fosfatidilserina espresse rispettivamente in unità GPS (IgG anti-fosfatidilserina) o MPS (IgM anti-fosfatidilserina). L'utente può usare un calibratore a punto singolo o una curva di calibrazione a quattro punti. Quando si esegue la calibrazione a punto singolo, per ricavare un fattore di conversione (rispettivamente per IgG e IgM) basta dividere il valore di concentrazione dei sieri di calibrazione per il valore di densità ottica del calibratore. I valori di densità ottica degli altri campioni moltiplicati per il fattore di conversione permettono di ottenere le concentrazioni di anticorpi IgG e IgM anti-fosfatidilserina in unità GPS o MPS. Per la calibrazione a più punti, eseguire l'analisi di regressione lineare con i valori dei calibratori in funzione dei valori di densità ottica dei calibratori. I risultati del controllo e del campione del paziente sono determinati dalla curva di calibrazione. Queste unità sono riconducibili alle preparazioni standard del Louisville Antiphospholipid Laboratory.

REAGENTI

Conservare a 2-8°C. Non congelare.

Ciascun kit per test REAADS anti-fosfatidilserina a 96 pozzetti contiene i seguenti reagenti (**i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit**).

- 12x8 micropozzetti rivestiti di fosfatidilserina (da cervello porcino), con telaio. (aPS IgG/IgM 12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml di diluente per campioni I (soluzione verde); contiene siero di vitello*. (Sample Diluent I)
- 0,250 ml di sieri di calibrazione* IgG umane (1-alto, 2-medio, 3-basso); vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi in unità GPS. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo. (aPS IgG Calibrator 1, aPS IgG Calibrator 2, aPS IgG Calibrator 2)
- 0,250 ml sieri di calibrazione* IgM umane (1-alto, 2-moderato, 3-basso); vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi in unità MPS. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo. (aPS IgM Calibrator 1, aPS IgM Calibrator 2, aPS IgM Calibrator 2)
- 0,250 ml di siero di controllo positivo* IgG (umano); vedere l'etichetta della fiala per il range previsto in unità GPS. (aPS IgG Positive Control)
- 0,250 ml di siero di controllo positivo* IgM (umano); vedere l'etichetta della fiala per il range previsto in unità MPS. (aPS IgM Positive Control)
- 0,250 ml di siero di controllo normale* (umano); vedere l'etichetta della fiala per i range previsti in unità GPS e MPS. (aPS IgG/IgM Normal Control)
- 15 ml di soluzione di anticorpi (ovini) anti-IgG umana coniugati con HRP (soluzione blu); contiene 0,01% di timerosal e solfato di gentamicina come conservanti. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml di soluzione di anticorpi (ovini) anti-IgM umana coniugati con HRP (soluzione rossa); contiene 0,01% di timerosal e solfato di gentamicina come conservanti. (HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml di substrato monocomponente (TMB/H₂O₂); pronto per l'uso. (Substrate TMB/H₂O₂)
- 15 ml di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico). (Stopping Solution 0.36N sulfuric acid)
- 2 flaconi (30 ml) di concentrato di lavaggio (33X PBS). (Wash Concentrate 33X PBS)

***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 in osservanza dei requisiti della FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti i derivati di sangue umano, inclusi i campioni prelevati dai pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si manipolano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante. È stato riportato che la sodio azide, a contatto con rame o piombo, può formare azidi metalliche. Tali azidi metalliche sono esplosive. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere eliminate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
6. Il substrato monocomponente può essere irritante per gli occhi e la cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Durante la manipolazione del substrato, indossare un paio di guanti e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
7. Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46).

Irritante . Riesgo biológico .

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero costituisce il campione più idoneo. Il sangue va prelevato per venipuntura e il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo 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. Non usare siero o plasma emolizzati, itterici o lipemici, poiché queste condizioni possono produrre risultati errati. Campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima dell'analisi.

È possibile usare plasma prelevato con il 3,2% di citrato di sodio. Prelevare il sangue per venipuntura e separare immediatamente il plasma dalla parte cellulare del sangue centrifugando a 1500g per 10 minuti. Il soprannatante va rimosso con grande attenzione dopo la centrifugazione per evitare la contaminazione a mezzo delle piastrine. Si consiglia di ripetere più di una volta i procedimenti di centrifugazione e separazione al fine di minimizzare la contaminazione da piastrine. Piastrine vecchie o lisate possono reagire con gli anticorpi antifosfolipidi e generare risultati errati. Se non vengono analizzati immediatamente, i campioni di plasma devono essere conservati analogamente a quelli di siero.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit REAADS per test anti-fosfatidilserina; per un elenco completo, vedere "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata per la preparazione della soluzione di lavaggio PBS e la taratura o azzeramento del lettore di piastre nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di dosare da 5 a 1000 µl, con punte appropriate
- Vetreria assortita adatta a piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone, 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 lettura di piastre in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanale per il dosaggio simultaneo in 8 pozzetti

Note procedurali

1. Portare i campioni di siero e i reagenti a temperatura ambiente (18-26 °C) e mescolarli bene prima dell'uso; **evitare la formazione di schiuma**. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni ed i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e dei sieri di analisi vanno eseguite immediatamente prima dell'esecuzione del dosaggio.
3. In ciascuna sessione di analisi, su ogni piastra, è possibile analizzare un singolo pozzetto bianco. A questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungervi invece 200 µl di acqua distillata immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Il lettore di piastre va programmato su "zero" o azzerato contro l'aria o contro un pozzetto bianco.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante ai fini del rendimento ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato, dirigere nel fondo dei micropozzetti un forte getto di soluzione di lavaggio erogato da un flacone di plastica morbida con punta larga. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. È anche possibile usare un sistema di lavaggio automatico per piastre di microtitolazione.

5. **IMPORTANTE:** eventuali residui di PBS possono causare un sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di dosare simultaneamente 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 del tempo 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 comincia al termine dell'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26 °C) possono generare risultati errati.
11. Durante il prelievo delle aliquote dalle fiale, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Per questa analisi, non utilizzare Tween 20 o detergenti di altro tipo.
13. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
14. Non utilizzare componenti di kit appartenenti a lotti differenti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio (PBS): misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS) e portare a 1 l con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS inutilizzata in frigorifero a 2-8°C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione crociata o batterica.

PROCEDURA DI ANALISI

1. Il dosaggio può essere eseguito con una calibrazione a punto singolo (calibratore 2) o con una curva di calibrazione a quattro punti (calibratori 1, 2 e 3, più diluente per campioni/bianco reagente come calibratore 4, pari a 0 unità GPS o 0 unità MPS). Un bianco reagente di controllo va inoltre analizzato per ciascun coniugato, IgG e IgM, sia con il metodo di calibrazione a punto singolo, sia con il metodo di calibrazione a più punti. Dispensare nel pozzetto il diluente per campione senza siero. Questo pozzetto sarà trattato come i pozzetti dei campioni in tutte le fasi successive del dosaggio.
2. Staccare tutte le strisce di pozzetti che non utilizzate, e riporle nella busta in dotazione.
3. Preparare una diluizione in rapporto 1:50 dei calibratori, controlli e campioni con diluente per campioni (soluzione verde); ad esempio, aggiungere 10 µl di campione a 490 µl di diluente per campioni I.
4. Aggiungere ai pozzetti appropriati 100 µl di calibratori, (incluso il bianco reagente/calibratore 4), controlli e campioni diluiti.
5. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di campione. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i campioni.
6. Lavare 4 volte con PBS. Per il lavaggio, ciascun pozzetto va riempito con PBS. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento deciso del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Per trattenere i pozzetti durante il lavaggio, il bordo dei pozzetti va afferrato saldamente al centro in alto e in basso. Asciugare il liquido residuo picchiettando su carta assorbente. Evitare l'essiccazione dei pozzetti tra le varie fasi dell'analisi.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di anticorpi anti-IgG umane coniugati con HRP (blu) ai pozzetti corrispondenti al calibratore IgG, ai controlli, al bianco reagente e ai campioni prelevati dal paziente. Aggiungere 100 µl di soluzione di anticorpi anti-IgM umane coniugati con HRP (rossa) ai pozzetti corrispondenti al calibratore IgM, ai controlli, al bianco reagente e ai campioni prelevati dal paziente.

8. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare le soluzioni di coniugato. Evitare la contaminazione crociata delle soluzioni di coniugato di anticorpi IgG e IgM.
9. Lavare 4 volte con PBS come indicato al passaggio 6. Con un movimento deciso, drenare il liquido e picchiettare su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
10. 100 µl di substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato ai pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
11. 100 µl di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) in ciascun pozzetto per la reazione enzimatica. Aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità della precedente aggiunta di substrato. La soluzione di substrato blu diventa gialla, mentre la soluzione incolore rimane invariata. Azzerare il lettore di piastre contro l'aria o contro il pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm (con riferimento a 650 nm nel caso di fascio doppio). I valori di densità ottica devono essere misurati entro 5 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

RISULTATI

Calibrazione a punto singolo

1. Se si sono analizzati il calibratore 2, i controlli e i campioni in duplicato, calcolare i valori medi di densità ottica.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione calibratore 2 (stampato sull'etichetta della fiala) per il valore di densità ottica o per il valore medio di densità ottica del siero di calibrazione.
3. Per ottenere un valore di concentrazione in unità GPS o MPS, moltiplicare il valore di densità ottica o il valore medio di densità ottica di ciascun controllo e campione del paziente per il fattore di conversione appropriato.

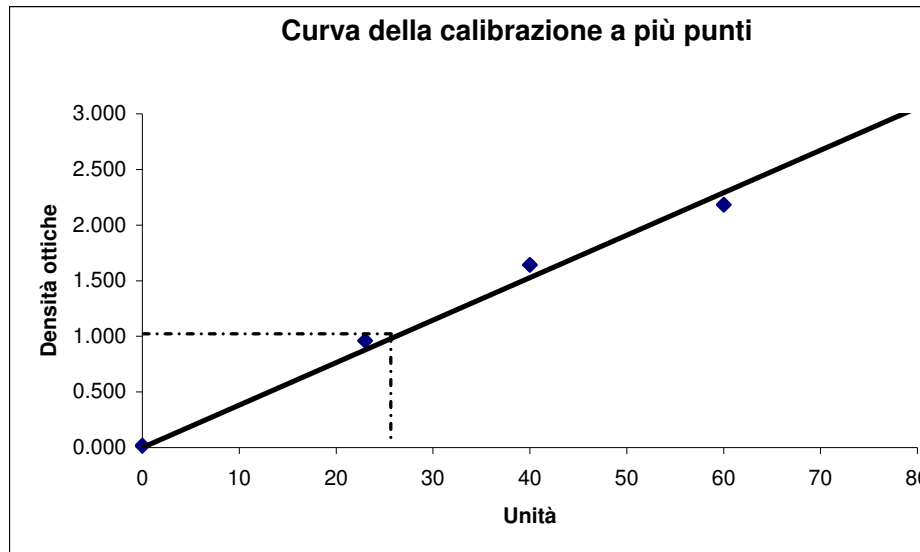
<p>Fattore di conversione =</p> $\frac{\text{Concentrazione di IgA anti-fosfatidilserina del calibratore 2 (unità GPS o MPS)}}{\text{Assorbanza del calibratore 2 (densità ottica - G o M)}}$ <p>Concentrazione di anti-fosfatidilserina del campione =</p> $\text{Fattore di conversione X assorbanza del campione (densità ottica)}$
--

4. Il fattore di conversione va calcolato per entrambi i calibratori in ogni dosaggio. Se si usa un fattore di conversione ottenuto da un altro dosaggio, o se si scambiano tra loro i fattori di conversione GPS a MPS, si ottengono risultati errati.

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 di regressione lineare con i quattro valori di calibrazione. (per le unità GPS o MPS, vedere le etichette dei flaconi; il calibratore 4 [diluente per campioni] equivale a 0 unità GPS o 0 unità MPS) rispetto alla media della densità ottica di ciascun calibratore.
3. La curva del calibratore può essere tracciata automaticamente usando un software convalidato o manualmente su carta millimetrata. Per evitare di ottenere valori negativi, si raccomanda di usare un'intercetta zero quando si genera la linea di regressione. Se questa opzione non è disponibile, gli eventuali valori negativi vanno riportati come unità zero. Per la generazione manuale della curva, congiungere con la linea più idonea i punti tracciati usando un'intercetta zero.

4. Determinare i valori del siero di controllo e del campione dalla curva del calibratore.
5. Esempio di una curva di calibrazione a più punti.



Usando la curva di calibrazione esemplificativa fornita, una densità ottica del campione pari a 1,000 a 450 nm corrisponderebbe a un valore calcolato pari a 26,2 unità. La curva di calibrazione è fornita esclusivamente a scopo esemplificativo e non va usata per calcolare i risultati dei pazienti. Una nuova curva di calibrazione va ottenuta con l'esecuzione di ciascuna analisi.

Controllo di qualità

1. Il valore di densità ottica del calibratore 2 deve essere almeno 0,600 garantire il corretto funzionamento del kit. Valori di densità ottica del calibratore 2 inferiori a 0,600 possono indicare che il kit non è più valido.
2. Dopo la calibrazione dello spettrofotometro sull'aria o sul pozzetto bianco, la densità ottica del calibratore 4 o del bianco reagente deve essere inferiore a 0,100. Valori superiori a 0,100 possono indicare la possibile contaminazione del reagente, o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori di anti-fosfatidilserina ottenuti per i sieri di controllo devono essere compresi nei range indicati sulle etichette dei rispettivi contenitori. Piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range sono accettabili.
4. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati da pazienti (se analizzati) devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per i campioni che hanno valori di assorbanza maggiori di 0,200.
5. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare i propri valori di cut-off per una determinata popolazione di pazienti. Ad esempio, vedere *Performance Characteristics, Clinical Specificity*.
6. I campioni con valori di anti-fosfatidilserina superiori a 100 GPS o 80 MPS possono essere refertati come "superiori a 100 GPS o 80 MPS".
7. Assicurarsi che tutti i parametri del controllo di qualità siano stati osservati (vedere la sezione Controllo di qualità) prima di refertare i risultati delle analisi.

VALORI DI RIFERIMENTO

130 campioni di siero ottenuti da donatori di sangue sani sono stati analizzati per gli anticorpi IgG anti-fosfatidilserina e 128 per gli anticorpi IgM anti-fosfatidilserina (aPS); sono stati stabiliti i seguenti intervalli di riferimento (media +3 deviazioni standard):

- meno di 16 GPS
- meno di 22 MPS

PREVALENZE PREVISTE

LES

I campioni di siero ottenuti da 53 soggetti affetti da LES sono stati analizzati con il kit. Diciassette campioni (32%) sono risultati positivi per gli anticorpi IgG anti-fosfatidilserina. Quattro campioni (8%) sono risultati positivi per gli anticorpi IgM anti-fosfatidilserina. In questo gruppo è stata riscontrata una buona correlazione ($r = 0,87$) tra il livelli di anticorpi IgG anti-fosfatidilserina e anti-cardiolipina.

Altre condizioni patologiche

Sono stati analizzati anche 27 campioni di siero provenienti da pazienti affetti da artrite reumatoide (AR). Solo un campione è risultato positivo per gli anticorpi IgG anti-fosfatidilserina. Nessun campione è risultato positivo per gli anticorpi IgM anti-fosfatidilserina.

L'importanza clinica dei risultati positivi nelle condizioni patologiche diverse dal LES è ancora in fase di indagine.

LIMITI DEL TEST

Le concentrazioni di anticorpi anti-fosfatidilserina ottenute con questo dosaggio costituiscono solo uno strumento diagnostico ausiliario. Il medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, dei dati fisici e di altre procedure diagnostiche. Se i risultati clinici suggeriscono la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi mentre il paziente è negativo per gli anticorpi anti-fosfatidilserina, alcuni ricercatori suggeriscono, per confermare il risultato negativo, di esaminare l'eventuale presenza di anticorpi anti-cardiolipina e anti- β_2 GPI e di lupus anticoagulante. Un paziente va considerato positivo per gli anticorpi anti-fosfolipidi se uno o tutti i test danno risultati positivi.

Bassi livelli di anticorpi anti-fosfatidilserina possono presentarsi temporaneamente in molte infezioni.^{18,19} Se un paziente risulta positivo ad una prima analisi mentre esistono segni clinici di infezione, il test va ripetuto nuovamente a sei-otto settimane.

GARANZIA












Si garantisce la performance di questo prodotto secondo quanto descritto nel presente foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per ottenere assistenza tecnica o per rivolgersi al servizio clienti, negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Fuori dagli Stati Uniti, chiamare il numero (303)-457-4345, inviare un fax al numero (303)-457-4519, o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. McNiel HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49:193-280.
2. Harris EN. Annotation. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 74:1-9.
3. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990; 112:682-698.
4. Sammaritano LR, Gharavi AE, Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome: immunologic and clinical aspects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1990; 20:81-96.
5. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome (Editorial). *J Rheumatol* 1986; 13:486-489.
6. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342:341-344.
7. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62:738-745.
8. Triplett DA. Assays for detection of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1994; 3:281-287.
9. Schick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976; 57:1221-1226.
10. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 42:63-75.
11. Barna LK, Triplett DA, Foster WM, Gaddis ML. A study of relationships among anti-phosphatidylserine and anticardiolipin antibodies, the lupus anticoagulant and clinical complications. *Lupus* 1994; 3:357.
12. Keedy K, Santos M, Lopez L. Prevalence of antibodies to anti-phosphatidylserine in autoimmune diseases. *Lupus* 1994; 3:344.
13. Keedy K, Santos M, Lopez L. Prevalence and clinical significance of anti-phosphatidylserine antibodies. *Arthritis Rheum* 1994; 37:S392.
14. Blank M, Tincani A, Shoenfeld Y. Induction of experimental antiphospholipid syndrome in naive mice with purified IgG antiphosphatidylserine antibodies. *J Rheumatol* 1994; 21:100-104.
15. McNiel H, Simpson R, Chesterman C, Krilis S. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120.
16. Kandiah D, Krilis S. Beta2-glycoprotein I. *Lupus* 1994; 3:207-212.
17. Keedy K, Santos M, Lopez L. Anti-phosphatidylserine antibodies require β_2 -glycoprotein I as cofactor in ELISA. *Lupus* 1994; 3:327.
18. Vaarala O, Palosuo T, Kleemola M, Aho K. Anticardiolipin response in acute infections. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1986; 41: 8-15.
19. Maclean C, Flegg PJ, Kilpatrick DC. Anti-cardiolipin antibodies and HIV infection. *Clinical Experimental Immunology*. 1990; 81: 263-266.

SYMBOL LEGEND

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



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



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

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

13030901 21
 Effective: 2008-01-11