

LABELING

Title: **REAADS IgM ANTI-BETA 2 GLYCOPROTEIN I
PACKAGE INSERT**

Document Number: 13038901

Supersedes/Date: 2006-08-31

CO No.: 07-0627

Revision: 11

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

Effective Date: 2008-01-11

Dimensions: Flat 8½" wide X 11" long

Folded / Booklet Format 5 ½" X 8 ½"

Colors: Black Text

Paper Stock: White

REAADS®
IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

For *In Vitro* Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of IgM anti-Beta 2 Glycoprotein I (β_2 GPI) antibodies in human serum or citrated plasma (3.2% sodium citrate).

INTENDED USE

For the detection and semi-quantitation of IgM anti- β_2 GPI antibodies in individuals with systemic lupus erythematosus (SLE) and lupus-like disorders (anti-phospholipid syndrome).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ANTI-BETA 2 GLYCOPROTEIN I 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 (e.g., 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 (APS).^{5,6}

Most autoimmune anti-phospholipid antibodies require a serum cofactor (β_2 GPI) for optimal binding.⁷⁻¹⁰ It has been shown that many anti-phospholipid antibodies may react to a neoepitope formed on the β_2 GPI molecule by the interaction between the phospholipid and β_2 GPI.^{11,12} Most assays for anti-phospholipid antibodies contain bovine serum as the source of cofactor. More recently, it has been shown that the binding of β_2 GPI to the microwell surface may produce a neoepitope similar to that when combined with a phospholipid and the results with this system showed a good correlation with the anti-phospholipid syndrome.¹³⁻¹⁶ The serologic detection of anti- β_2 GPI antibodies provides enhanced clinical sensitivity for thrombosis. The REAADS Anti- β_2 GPI ELISA Test Kit uses the well known ELISA format to detect anti- β_2 GPI antibodies in human serum.

Patients with positive reactions to both anti-phospholipid and anti- β_2 GPI assays were more likely to have clinical complications than those positive for only one. Higher prevalence and mean serum levels of IgM anti- β_2 GPI antibodies have been reported in autoimmune patients. In addition, anti- β_2 GPI antibodies in SLE patients correlated with clinical manifestations of anti-phospholipid syndrome.¹⁷

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum or plasma samples, calibrator sera, and controls are incubated in microwells coated with purified human β_2 GPI. Incubation allows the anti- β_2 GPI 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 IgM, labeled with horseradish peroxidase (HRP), are added forming complexes with the β_2 GPI bound antibodies. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of a single solution containing tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the serum concentration of anti- β_2 GPI 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 IgM anti- β_2 GPI antibody concentrations expressed in M units. The user has the option of running either a single point calibrator or a four-point calibration curve. For single point calibration, dividing the concentration value of the calibrator sera by the O.D. value of the calibrator provides a conversion factor. The O.D. values of the other samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgM anti- β_2 GPI antibody concentrations in M units. For multipoint calibration, perform a linear regression analysis with calibrator values against calibrator O.D.s. Controls and patient results are determined from the calibration curve.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS IgM Anti- β_2 GPI 96-Microwell Test Kit contains the following reagents (volumes may vary depending on the kit size and configuration):

- 12 x 8 stabilized β_2 GPI (from human serum) coated microwells with frame
- 60 mL Sample Diluent IV (blue-green solution)
- 3 vials (0.250 mL) IgM β_2 GPI Calibrator Serum* (1-high, 2-moderate, 3-low) (human); see vial label for antibody concentration in M units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration
- 0.250 mL IgM β_2 GPI Positive Control Serum* (human); see vial label for expected M unit range
- 0.250 mL Normal Control Serum* (human); see vial label for expected M unit range
- 15 mL anti-human IgM (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution)
- 15 mL One Component Substrate Solution (TMB and H₂O₂); ready to use
- 15 mL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid)
- 2 bottles (30 mL) Wash Concentrate (33X PBS/Tween)

***CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Human source material used to prepare the calibrators and controls included in this kit has been tested and shown to be negative 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 Solution can cause irritation to the eyes and skin. 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 or citrated plasma (3.2% sodium citrate) should be used as the sample matrix.

Blood should be collected by venipuncture and the serum separated from the cells by centrifugation after clot formation. If not tested immediately, the 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.

If citrated plasma is to be used, blood should be collected by venipuncture and the plasma separated from the cells immediately by centrifugation at 1500g for 10 minutes. The supernatant must be carefully removed after centrifugation to avoid contamination with platelets. Repeating the centrifugation and separation steps may be advisable to minimize platelet contamination. Lysed or aged platelets can lead to aberrant results. If not tested immediately, plasma samples should be stored as described for serum.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided

REAADS IgM Anti- β_2 GPI Test Kit; see “Reagents” section 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 μ L and 1000 μ L, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for handling small volumes
- Flasks or bottles, 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 (650 nm reference if dual beam)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously
- Microdilution tubes and a 96-well microdilution tube holder for sample dilutions and rapid delivery to microwell plate

Procedural Notes

1. Bring serum or plasma samples and kit reagents to room temperature and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage as soon as possible.
2. All dilutions of calibrators, controls, and test sera or plasma must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well can be included in each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 μ L 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 an 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 plate washing system can also be used.

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

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

Assay Procedure

1. The assay can be performed with a single point calibration (Calibrator 2) or a four-point calibration curve (Calibrators 1, 2, and 3 plus sample diluent/reagent blank as Calibrator 4 equal to 0 M units). A reagent blank control should also be run with the single point and multipoint calibration method. Sample Diluent without serum or plasma is added to the well. This well will be treated the same as a control or patient sample in subsequent assay steps.
2. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
3. Prepare a 1:50 dilution of the calibrators, controls, and patient samples in sample diluent (blue-green solution); e.g., 10 μ L sample added to 490 μ L Sample Diluent equals a 1:50 sample dilution.
4. Add 100 μ L of diluted calibrators (including the reagent blank/Calibrator 4), controls, and patient samples 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 wash solution. Each well should be filled with wash solution per wash. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. To retain microwell modules during washing, the frame must be squeezed at the top and bottom of the longest sides. 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 IgM HRP-Conjugated Antibody Solution (red) to the wells.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solution.
9. Wash 4 times with wash solution, as in step 6. Use a snapping motion to drain the liquid and blot on absorbent towels after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
10. Add 100 μ L One Component Substrate to each well and incubate for 10 minutes at room temperature. Add substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
11. Add 100 μ L Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add the acid to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue Substrate will turn yellow and colorless solution will remain colorless. Blank or zero the plate reader against an air or a water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm (and 650 nm reference if dual beam). The O.D. values should be measured within 5 minutes of the addition of the Stopping Solution.

RESULTS

Single Point Calibration

1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of Calibrator 2, Controls and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on 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 conversion factor to obtain an anti- β_2 GPI antibody concentration value expressed in M units.

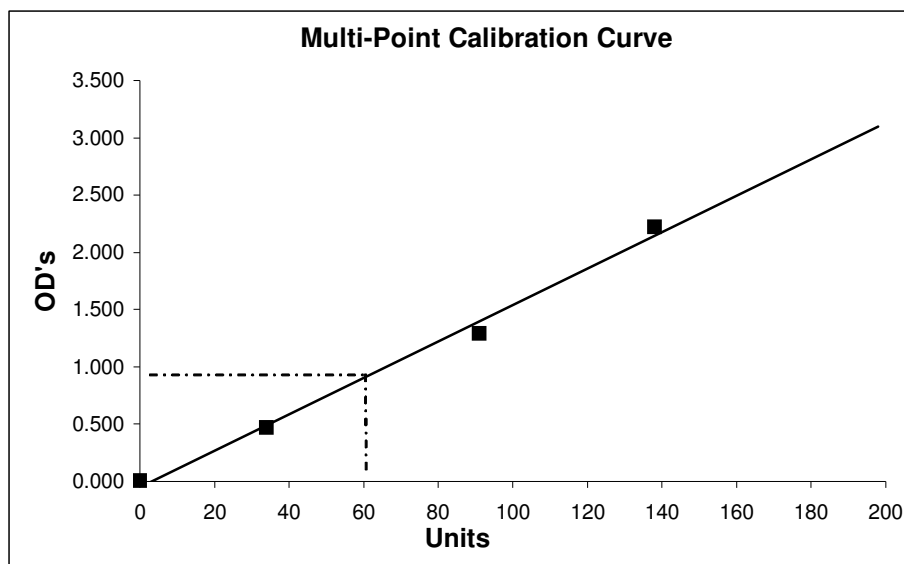
$$\text{Conversion Factor} = \frac{\text{Anti-}\beta_2\text{GPI Concentration of Calibrator 2}}{\text{Absorbance Value of the Calibrator 2 (O.D.)}}$$

$$\text{Anti-}\beta_2\text{GPI Concentration of Sample} = \text{Conversion Factor} \times \text{Absorbance of the Sample (O.D.)}$$

4. The Conversion Factor must be calculated for the Calibrator 2 for each assay run. Using a Conversion Factor from another assay will invalidate the results.

Multi-Point Curve Calibration

1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of the calibrators, controls and patient samples were performed.
2. Perform linear regression analysis with the four calibrator values against the mean O.D.s for each calibrator. (See vial labels for M units; Calibrator 4 [sample diluent] is equal to 0 M units.)
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 0.860 at 450nm would correspond to a calculated value of 60 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 the 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 0.050 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.050 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The anti- β_2 GPI values obtained for the control sera should be within the ranges indicated on the vial labels. Occasional small deviations outside these ranges are acceptable.
4. O.D. values for duplicates 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.
6. Samples with anti- β_2 GPI values greater than 200 M units may be reported as "greater than 200 M units."
7. Assure that all quality control parameters have been met before reporting test results.

NORMAL RANGE

Serum samples from 120 healthy blood donors were tested for IgM anti- β_2 GPI antibodies. The following normal range was established:

- Less than 20 M units

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Normal Samples:

Serum samples from 120 healthy blood donors were assayed for the presence of IgM anti- β_2 GPI antibodies. Using the established cutoff value of 20 M units, this normal population demonstrated 93% specificity (mean value = 7.7 M units).

Serum samples from 41 infectious disease (syphilis), 42 progressive systemic sclerosis (PSS), and 42 rheumatoid arthritis (RA) patients were assayed for the presence of IgM anti- β_2 GPI antibodies. These patient groups demonstrated similar results compared to the healthy blood donor population (mean values = 9.7, 10.1, and 11.1 M units respectively). Results of these groups along with the healthy blood donors are summarized in the table below.

IgM anti- β_2 GPI	Healthy	Infectious (syphilis)	PSS	RA
# of Samples (n)	120	41	42	42
Mean (M units)	7.7	9.7	10.1	11.1
Standard Deviation	9.5	17.9	15.1	16
% Negative	92.5%	95.0%	92.9%	88.1%

Clinical Sensitivity

Systemic Lupus Erythematosus (SLE):

Serum samples from 40 unselected (consecutive) patients with SLE were tested with this kit. Eight of the samples (sensitivity of 20%) were positive for IgM anti- β_2 GPI antibodies (mean value = 14 M units).

Serum samples from 12 selected female patients with SLE who had a clinical history of thrombosis, thrombocytopenia or recurrent fetal loss were evaluated for IgM anti- β_2 GPI antibodies. Five of the samples (sensitivity of 42%) were positive in this population (mean value = 24 M units).

SLE Controls:

Serum samples from five selected female patients with SLE who had history of thrombocytopenia (no thrombosis) were tested for IgM anti-β₂GPI antibodies. None tested positive, and the resulting mean value was 6 M units for this group.

Serum samples from nine selected female patients with SLE who were known not to have had thrombotic episodes, nor any other feature of the anti-phospholipid syndrome, were tested in the assay. One sample (11%) was weak positive for IgM anti-β₂GPI antibodies, with a mean value of 9 M units for this group.

Primary Anti-phospholipid Syndrome (APS):

Serum samples from nine patients with the diagnosis of primary anti-phospholipid syndrome (APS) were tested on the REAADS IgM anti-β₂GPI assay (Lot GW-001). Three of the nine samples resulted positive (33.3% sensitivity) with a mean value of 32.7 M units. A summary of sensitivity testing is presented below:

	Unselected SLE	Selected SLE		Primary APS
		No Thrombosis	Thrombosis	
# of Samples (n)	40	14	12	9
Mean (M units)	13.9	8.0	24.4	32.7
Standard Deviation	18.1	10.3	24.8	37.3
% Positive	20.0%	7.1%	41.7%	33.3%

Technical Performance Comparison

Two disease populations (unselected SLE and primary APS) were tested on REAADS IgM anti-β₂GPI ELISA and a predicate device to study the correlation between positive and negative results. The results are summarized in the table presented below.

		REAADS IgM anti-β₂GPI			
		Negative	Positive		
Predicate Device IgM anti-β₂GPI	Negative	35	4	Relative Sensitivity	70%
	Positive	3	7	Relative Specificity	90%
				Agreement:	86%

Precision

Three samples with known M unit values (one low, one moderate, and one high) were assayed in 23 replicates on three different occasions. The mean intra-assay and inter-assay coefficients of variation (%CVs) are presented in the table below. The reported intra-assay coefficient of variation is the mean of the three separate intra-assay CVs. Inter-assay CV is the coefficient of variation obtained from three plates from one lot.

	Value Range	Mean Intra-assay %CV	Mean Inter-assay %CV
Low	13 - 16 M units	3.8%	6.1%
Moderate	44 - 56 M units	3.5%	4.5%
High	73 - 82 M units	2.4%	3.4%

LIMITATIONS OF THE TEST

The anti- β_2 GPI 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- β_2 GPI antibodies, some investigators recommend testing for anti-cardiolipin antibodies, anti-phosphatidylserine antibodies, and the lupus anticoagulant to confirm the negative result. A patient may be considered positive for anti-phospholipid antibodies if one or all of the tests give positive results.

Warranty

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

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

REAADS®
IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

In-vitro-Diagnostikum

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur semiquantitativen Bestimmung von IgM-Anti-Beta 2 Glykoprotein I (β_2 GPI)-Antikörpern in Humanserum oder Zitratplasma (3,2 % Natriumzitat).

ANWENDUNGSBEREICH

Nachweis und semiquantitative Bestimmung von IgM-Anti- β_2 GPI-Antikörpern bei Personen mit Lupus erythematosus (SLE) oder lupusartigen Erkrankungen (z.B. Antiphospholipid-Syndrom).

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. Proben verdünnten Serums oder Plasmas, Kalibratorseren und Kontrollen werden in Mikrovertiefungen inkubiert, die mit gereinigtem Human β_2 GPI beschichtet sind. Die Inkubation ermöglicht eine Reaktion der in den Proben enthaltenen Ant- β_2 GPI-Antikörper mit dem immobilisierten Antigen. Nach dem Auswaschen nicht gebundener Serum- oder Plasmaproteine werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, für Human-IgM spezifische Antikörper zugefügt, die mit den an β_2 GPI gebundenen Antikörpern komplexieren. Nach einem weiteren Waschschriff wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe einer Lösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid enthält, (H_2O_2) angefärbt. In den Vertiefungen entsteht eine Färbung, deren Intensität in direkter Beziehung zur Anti- β_2 GPI-Antikörper-Serum-Konzentration steht.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bzw. Extinktion in allen Vertiefungen mit einem Spektrophotometer. Es werden Kalibrationsseren mit geliefert, deren IgM-Anti- β_2 GPI-Antikörper-Konzentrationen in M-Einheiten angegeben sind. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Vierpunkt-Kalibrierungskurve verwenden. Für die Einpunktkalibration wird die Konzentration der Kalibratorseren durch die optische Dichte (OD) des Kalibrators dividiert und ein Umrechnungsfaktor erhalten. Die OD-Werte der anderen Proben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der IgM-Anti- β_2 GPI-Antikörper in M-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 Kalibrierungskurve bestimmt.

REAGENZIEN

Bei 2-8°C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS IgM Anti- β_2 GPI-Testkit (für insgesamt 96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien (**die Volumina sind je nach Kitgröße und -konfiguration unterschiedlich**):

- 12x8 beschichtete Mikrovertiefungen mit Rahmen, mit stabilisiertem β_2 GPI (aus Humanserum). (12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml Probenverdünner II (blau-grüne-Lösung). (Sample Diluent IV)
- 3 Fläschchen (0,250 ml) IgM- β_2 GPI-Kalibratorserum* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig) (human); Antikörperkonzentration in M-Einheiten: siehe Fläschchenetikett. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden. (IgM Calibrator 1, IgM Calibrator 2, IgM Calibrator 3)

- 0,250 ml IgM-β₂GPI-Kontrollserum*, positiv (human); Erwartungsbereich in M-Einheiten: siehe Fläschchenetikett. (IgM Positive Control)
- 0,250 ml Kontrollserum*, normal (human); Erwartungsbereich in M-Einheiten: siehe Fläschchenetikett. (IgM Normal Control)
- 15 ml Anti-human-IgM- Ziegen-Antikörper-Lösung, HRP-konjugiert (rote Lösung). (IgM 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 (30X PBS/Tween). (Wash Concentrate PBS/Tween (33x))

***ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur Herstellung der in diesem Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV und HIV 1 und 2 reagierten. Trotzdem sollten alle Humanblutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Bestimmte Bestandteile dieses Produkts enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Azidhaltige Lösungen müssen beim Ausgießen in den Abfluss mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in den Wasserrohren zu vermeiden.
6. Das Einkomponenten-Substrat kann eine Irritation der Augen und der Haut verursachen. 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

Als Probenmatrix sollte Serum oder Zitratplasma (3,2 % Natriumzitat) verwendet werden.

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. Hämolysiertes, 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.

Bei Verwendung von Zitratplasma sollte Blut durch Venenpunktion abgenommen und das Plasma durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 g sofort von den Vertiefungen getrennt werden. Der Überstand

muss nach dem Zentrifugieren sorgfältig entfernt werden, um eine Kontamination mit Blutplättchen zu vermeiden. Wiederholtes Zentrifugieren und Separieren kann eine Blutplättchenkontamination minimieren. Lysierte oder alte Blutplättchen können die Ergebnisse verfälschen. Werden die Plasmaproben nicht sofort analysiert, sind sie wie für Serum beschrieben zu lagern.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien

REAADS IgM Anti- β_2 GPI-Testkit; vollständige Liste: siehe Abschnitt „Reagenzien“.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der PBS-Waschlösung und zum Nullabgleich des Plattenlesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten zur Abgabe von Volumen zwischen 5 und 1000 μ l mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumina
- Kolben oder Flaschen, 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 (650 nm als Referenzwellenlänge bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können.
- Mikrodilutionsröhrchen und ein Mikrodilutionsröhrchenständer mit 96 Vertiefungen für Probenverdünnungen und rasche Abgabe an Mikrotiterplatten

Hinweise zur Durchführung

1. Serum- bzw. Plasmaproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen - nicht aufschäumen. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren bzw. Testplasma dürfen erst kurz vor dem Test 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 μ l 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 Plastikspritzenflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Waschlösung in der für die Wasser-Blindprobe reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. **WICHTIG:** Wenn restliche Waschlösung nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichmäßigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Vertiefungen.
7. Exakte Zeitkontrolle bei allen Testschritten ist wichtig. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von Minuten zugefügt werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit dem Ende der Reagenzien- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der normalen Raumtemperatur (18-26 °C) kann die Ergebnisse verfälschen.

11. Beim Öffnen der Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine mikrobielle Kontamination und eine Kreuzkontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
13. Die Komponenten verschiedener Kit-Chargen nicht mischen.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung (PBS/Tween): 30 ml Waschkonzentrat 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 Waschlösung im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Der Test kann mit einer Einpunktkalibrierung (Kalibrator 2) oder mit einer Vierpunkt-Kalibrierung (Kalibrator 1, 2 und 3 plus Probenverdünner/Blindprobe als Kalibrator 4, gleich 0 M-Einheiten) durchgeführt werden. Eine Reagenzien-Leerkontrolle sollte auch bei der Einpunkt- und Mehrpunktkalibration durchgeführt werden. Es wird Probenverdünner ohne Serum und ohne Plasma in die Vertiefung gegeben. Diese Vertiefung wird im weiteren Testverlauf wie eine Kontrolle bzw. Patientenprobe behandelt.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und im bereitgestellten Säckchen aufbewahren.
3. Jeweils eine Verdünnung 1:50 von Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Probenverdünner (blau-grüne Lösung) herstellen. Beispiel: 10 µl Probe plus 490 µl Probenverdünner ergeben eine Verdünnung 1:50 der Probe.
4. 100 µl der verdünnten Kalibratoren (einschließlich Blindprobe/Kalibrator 4), Kontrollen und Patientenprobe(n) den jeweiligen Mikrovertiefungen beifügen.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
6. Viermal mit Waschlösung waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschvorgang mit Waschlösung gefüllt werden. Nach jedem Waschschrift wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Die Halterung an den längeren Seiten zusammendrücken, um die Mikrovertiefungen während des Waschens zu sichern. Auf saugfähigem Papier abtupfen, um die Waschlösung restlos zu entfernen. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Waschschriften nicht austrocknen.
7. 100 µl HRP-konjugierte Anti-Human-IgM-Antikörper-Lösung (rot) in die Vertiefungen geben.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösungen durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
9. Wie in Schritt 6 beschrieben viermal mit Waschlösung waschen. Nach dem letzten Waschvorgang durch eine rasche Drehbewegung die Flüssigkeit abfließen lassen und auf saugfähigen Tüchern trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
10. Jeder Vertiefung 100 µl Einkomponentensubstrat zugeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (Schwefelsäure 0,36 N) pro Vertiefung beendet. Die Säure muss in der gleichen Reihenfolge und in gleicher Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während die bisher farblos gebliebene Lösung weiterhin farblos bleibt. 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 abgelesen werden.

ERGEBNISSE

Einpunktkalibrierung

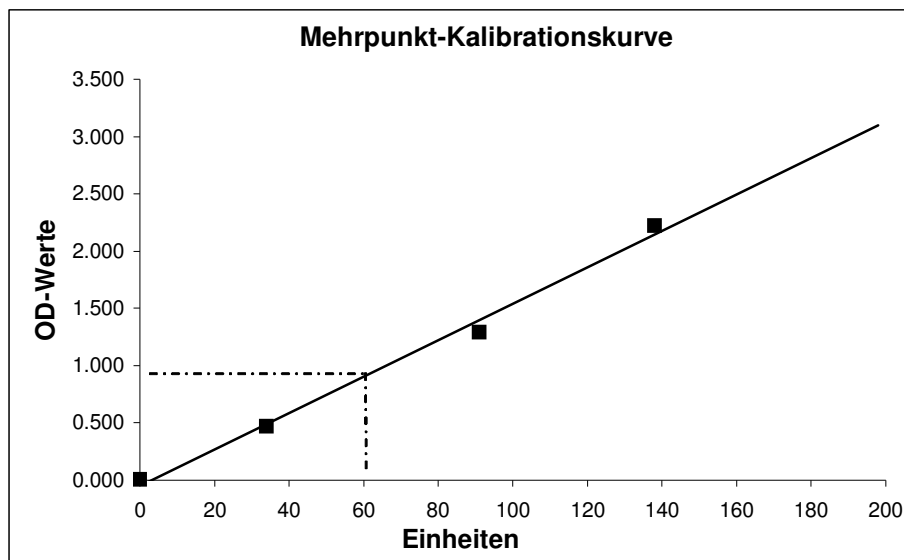
1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibrator 2, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Zur Berechnung des Umrechnungsfaktors die Konzentration von Kalibrator 2 (auf Fläschchenetikett angegeben) durch den OD-Wert bzw. OD-Mittelwert des Kalibratorserums dividieren.
3. Die OD-Wert bzw. OD-Mittelwerte der einzelnen Kontrollen und Patientenproben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration der Anti- β_2 GPI-Antikörper in M-Einheiten zu erhalten.

Umrechnungsfaktor =	$\frac{\text{Anti-}\beta_2\text{GPI-Konzentration des Kalibrators 2}}{\text{Extinktion des Kalibrators 2 (OD)}}$
Anti- β_2 GPI-Konzentration der Probe =	Umrechnungsfaktor X Extinktion der Probe (OD)

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

Kalibration über Mehrpunktkurve

1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Mit den vier Kalibratorwerten (die M-Einheiten sind auf den Fläschchenetiketten angegeben; Kalibrator 4 [Probenverdünner] entspricht 0 M-Einheiten) eine lineare Regressionsanalyse gegen die OD-Mittelwerte 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 0,860 bei 450 nm einem berechneten Wert von 60 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. Der OD-Wert des Kalibrators 2 sollte mindestens 0,600 betragen, um sicherzustellen, dass der Kit ordnungsgemäß funktioniert. OD-Werte von weniger als 0,600 für Kalibrator 2 können darauf hinweisen, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Der OD-Wert für Kalibrator 4 oder Blindprobe sollte unter 0,050 liegen, wenn das Spektrophotometer gegen die mit Wasser gefüllte Vertiefung auf Null gestellt wurde. Höhere Werte können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Platte bedingt sein.
3. Die Anti- β_2 GPI-Werte für die Kontrollseren sollten innerhalb des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereichs liegen. Gelegentliche geringe Abweichungen von diesem Bereich sind gestattet.
4. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen 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.
6. Proben mit Anti- β_2 GPI-Werten oberhalb von 200 M-Einheiten können als „über 200 M-Einheiten“ registriert werden.
7. Bevor die Analysenergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind.

NORMALBEREICH

Es wurden Serumproben von 120 gesunden Blutspendern auf IgM-Anti- β_2 GPI-Antikörper getestet. Der folgende Normalbereich wurde festgelegt:

- Weniger als 20 M-Einheiten

GRENZEN DES TESTS

Die Anti- β_2 GPI-Antikörperkonzentrationen aus diesem Test sind nur als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel gedacht. Jeder Arzt muss dieses Ergebnis unter Einbeziehung des Krankheitsablaufes, der Patientendaten, des physischen Befundes und anderen diagnostischen Untersuchungen betrachten. Wenn klinische Befunde darauf hindeuten, dass Antiphospholipid-Antikörper vorhanden sind, der Patient jedoch negativ auf Anti- β_2 GPI-Antikörper getestet, empfehlen manche Autoren den Test auf Anti-Kardiolipin-Antikörper, Anti-Phosphatidylserin-Antikörper und das Lupus-Antikoagulans (LA) zur Bestätigung des negativen Ergebnisses. Ein Patient kann als positiv für Anti-Phospholipid-Antikörper betrachtet werden, wenn ein oder alle Tests ein positives Resultat ergeben.

Garantie

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

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

REAADS®
IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Dosage immunoenzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgM anti-bêta 2 glycoprotéine I (β_2 GPI) dans le sérum ou le plasma citraté (citrate de sodium 3,2 %) humain.

UTILISATION

Pour la détection et la semi-quantification des anticorps IgM anti- β_2 GPI chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et de troubles de type lupique (syndrome des antiphospholipides).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Les micropuits enduits de β_2 GPI humaine purifiée sont incubés avec les échantillons de sérum ou de plasma dilués, les sérums étalons et les contrôles. L'incubation permet aux anticorps anti- β_2 GPI 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'IgM humaine marqués à la peroxydase du raifort (PR) sont ajoutés et forment des complexes avec les anticorps liés de β_2 GPI. 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- β_2 GPI du sérum.

Le résultat s'obtient par lecture de la D.O. (densité optique ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Des sérums d'étalonnage sont fournis et la concentration d'anticorps IgM anti- β_2 GPI est exprimée en unités M. L'utilisateur peut choisir d'utiliser un étalonnage à point unique ou une courbe d'étalonnage à quatre points. Dans le cas d'un étalonnage à point unique, le facteur de conversion s'obtient en divisant la valeur de la concentration de l'étalon par sa D.O. Les valeurs de D.O. des autres échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir les concentrations des anticorps IgM anti- β_2 GPI en unités M. 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.

RÉACTIFS

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

Chaque kit d'anti- β_2 GPI IgM 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 β_2 GPI stabilisé (provenant de sérum humain), avec cadre. (12 x 8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml de tampon pour échantillon IV (solution bleu-vert). (Sample Diluent IV)
- 3 flacons (0,250 ml) de sérum* IgM β_2 GPI (humain) étalon (1-élevé, 2-modéré, 3-bas); voir les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités M. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique. (IgM Calibrator 1, IgM Calibrator 2, IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml de sérum* IgM β_2 GPI (humain) positif de contrôle; voir l'étiquette du flacon pour la plage en unités M prévue. (IgM Positive Control)

- 0,250 ml de sérum* (humain) normal de contrôle; voir l'étiquette du flacon pour les plages en unités M prévues. (IgM Normal Control)
- 15 ml de conjugué anticorps de chèvre anti-IgM humaine/PR (solution rouge). (IgM 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/Tween). (Wash Concentrate PBS/Tween (33x))

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

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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 & 1 selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons patient, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants de ce produit contiennent de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.
6. La solution substrat à un composant peut causer une irritation des yeux et de la peau. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources d'embranchement. 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

Du sérum ou du plasma citraté (citrate de sodium à 3,2 %) doit être utilisé à titre de matrice d'échantillon.

Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le sérum immédiatement séparé des cellules par centrifugation après la formation du caillot. Si 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 la recongélation. De même, ne pas utiliser des plasmas ou des sérums hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester.

Si du plasma citraté est utilisé, le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le plasma immédiatement séparé des cellules par centrifugation à 1500 g durant 10 minutes. Pour cela, séparer soigneusement le plasma des cellules après la centrifugation, afin d'éviter la contamination par les plaquettes. Répéter l'opération si nécessaire. Des plaquettes lysées ou anciennes peuvent générer des résultats aberrants. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons de plasma doivent être stockés de la manière décrite pour le sérum.

MODE D'EMPLOI Matériel fourni

Kit de test Anti- β_2 GPI IgM 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 μ l et 1 000 μ l, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacons ou bouteilles 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 (référence à 650 nm si à double faisceau)
- Pipettes multicanal capables d'alimenter 8 puits simultanément.
- Tubes de microdilution et un support de tubes de microdilution pour 96 puits pour diluer les échantillons et les poser rapidement sur la plaque de micropuits

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de sérum ou de plasma et les réactifs à température ambiante et bien mélanger avant utilisation, éviter la formation de mousse. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur.
2. Diluer les étalons, les contrôles et les tests de sérum ou de plasma extemporanément.
3. Un unique puits d'eau à blanc peut être 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 μ l 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 un puits d'air ou d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. La présence de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de plaque.
5. IMPORTANT: L'élimination imparfaite des résidus de solution mère risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de délivrer dans 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Il est impératif d'ajouter en moins de cinq minutes tous les étalons, contrôles et échantillons. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. 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 microbienne ou croisée des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
13. Ne pas utiliser ensemble, des réactifs provenant de lots différents.

Préparation des réactifs

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

Procédure de dosage

1. Le dosage peut être effectué avec un étalonnage à point unique (étalon 2) ou une courbe d'étalonnage à quatre points (étalon 1, 2 et 3 plus tampon pour échantillon/réactif à blanc à titre d'étalon 4 égal à 0 unité M). Un réactif à blanc de contrôle doit aussi être analysé avec la méthode d'étalonnage à point unique et à multipoint. Du tampon pour échantillon sans sérum ou plasma est ajouté au puits. Ce puits sera traité de la même manière qu'un contrôle ou un échantillon patient dans les étapes suivantes du dosage.
2. Retirer toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Diluer les échantillons, les étalons et les contrôles au 1/50e dans le tampon pour échantillon (solution bleu-vert). Exemple: 10 µl d'échantillon et 490 µl de tampon pour échantillon 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 à l'aide de solution mère. Chaque puits doit être rempli de solution mère à chaque lavage. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Pour retenir les micropuits durant le retournement et le lavage, serrer le cadre par le dessus et le dessous de ses côtés longs. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer les résidus de liquide de lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
7. Ajouter 100 µl de conjugué anticorps anti-humain IgM/PR (rouge) aux puits.
8. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et vider la solution conjuguée.
9. Laver 4 fois à l'aide de solution mère ainsi que décrit à l'étape 6. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet et sécher sur des serviettes absorbantes après le lavage final. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
10. Ajouter 100 µl de solution substrat à un composant dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Ajouter de la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
11. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter l'acide aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution incolore reste incolore. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur 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 pour obtenir la concentration d'anticorps anti- β_2 GPI en unités M.

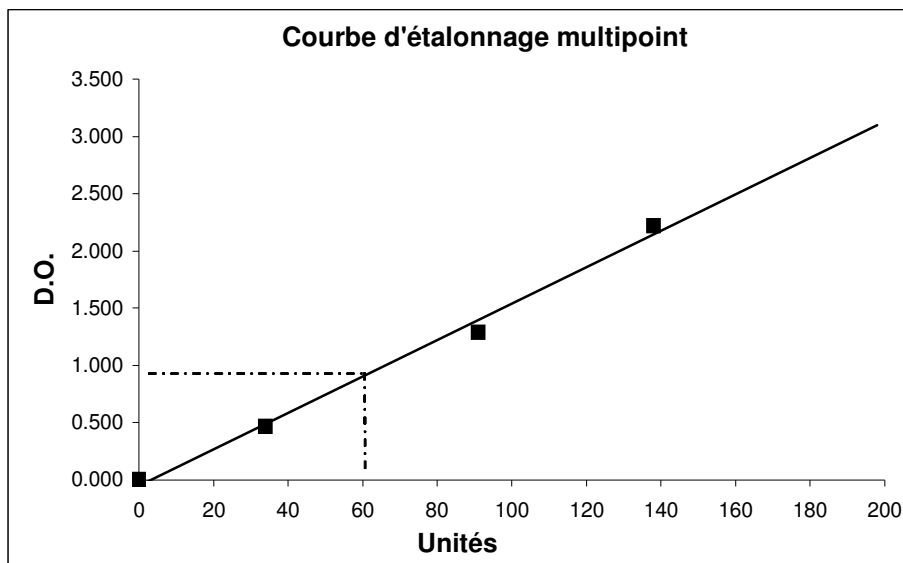
$$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Concentration en anti-}\beta_2\text{GPI de l'étalon 2}}{\text{Densité optique de l'étalon 2 (D.O.)}}$$

$$\text{Concentration en anti-}\beta_2\text{GPI de l'échantillon} = \text{Facteur de conversion} \times \text{Absorbance (D.O.) de l'échantillon}$$

4. Le facteur de conversion doit être calculé pour l'étalon à chaque dosage. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage 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 M des étiquettes des flacons ; l'étalon 4 [tampon pour échantillon] est égal à 0 unité M) comparées à la D.O. moyenne 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 0,860 à 450 nm correspondrait à une valeur calculée de 60 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 arrivé à péremption.
2. La D.O. obtenue pour l'étalon 4, réactif à blanc, doit être inférieure à 0,050 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,050 peut indiquer que le réactif a été contaminé ou que la plaque a été mal lavée.
3. Les valeurs en anti- β_2 GPI obtenues pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette indiquée sur les étiquettes des flacons. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Les valeurs de densité optique 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 d'absorbance sont supérieurs à 0,200.
5. Chaque laboratoire doit confirmer régulièrement ses valeurs seuil normales de la population de patients appropriée.
6. Les échantillons dont les valeurs d'anti- β_2 GPI sont supérieures à 200 unités M peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 200 unités M ».
7. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis avant de communiquer les résultats des tests.

PLAGE NORMALE

120 échantillons provenant de donneurs de sang sains ont été testés pour les anticorps IgM anti- β_2 GPI. Les plages normales suivantes ont été établies :

- Inférieure à 20 unités M

LIMITATIONS DU TEST

Les valeurs obtenues d'anticorps anti- β_2 GPI 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 anti- β_2 GPI, certains chercheurs recommandent un dosage pour les anticorps anticardiolipine, les anticorps antiphosphatidylsérine et l'anticoagulant lupus (LA) afin de confirmer le résultat négatif. On peut estimer qu'un patient est positif pour les anticorps antiphospholipides si un test ou tous les tests donnent un résultat positif.

Garantie

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

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

REAADS®
IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

Un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM anti-beta 2 glucoproteína I (β_2 GPI) en suero o plasma citratado (citrato de sodio al 3,2%) humanos.

INDICACIONES

Para la detección y semicuantificación de anticuerpos IgM anti- β_2 GPI en individuos con lupus eritematoso diseminado (LED) y enfermedades seudolúpicas (síndrome antifosfolipídico).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero o plasma, los sueros calibradores y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de β_2 GPI humana purificada. La incubación permite que los anticuerpos anti- β_2 GPI presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Después de retirar mediante lavado las proteínas séricas o plasmáticas no retenidas, se añaden anticuerpos específicos para IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (HRP); estos anticuerpos específicos forman complejos con los anticuerpos retenidos en β_2 GPI. 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 anti- β_2 GPI.

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 IgM anti- β_2 GPI expresadas en unidades M. El usuario tiene la opción de usar un calibrador de un solo punto o una curva de calibración de cuatro puntos. En la calibración de un solo punto, para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero calibrador por el valor de la D.O. del calibrador. Los valores de la D.O. de las demás muestras se multiplican por el factor de conversión para obtener las concentraciones de anticuerpos IgM anti- β_2 GPI en unidades M. 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 controles y los resultados de pacientes se determinan a partir de la curva de calibración.

REACTIVOS

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

Cada equipo de determinación de anti- β_2 GPI IgM REAADS de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos (los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo):

- 12x8 micropocillos recubiertos de β_2 GPI estabilizada (de suero humano). (12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml de diluyente de la muestra IV (solución verde-azulada). (Sample Diluent IV)
- 3 frascos de 0,250 ml de suero* calibrador IgM β_2 GPI (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humano); véase en la etiqueta del frasco la concentración de anticuerpo en unidades M. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto. (IgM Calibrator 1, IgM Calibrator 2, IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml de suero* humano de control positivo de IgM β_2 GPI; los rangos de la unidad M esperados se especifican en la etiqueta del frasco. (IgM Positive Control)
- 0,250 ml de suero* humano de control normal; los rangos de la unidad M esperados se especifican en la etiqueta del frasco. (IgM Normal Control)

- 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP-(solución roja). (IgM HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de solución 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 y Tween). (Wash Concentrate PBS/Tween (33x))

***PRECAUCIÓN: Contiene de azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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. Una solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular o cutánea. Utilice guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
7. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:
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

Como matriz de muestra debe emplearse suero o plasma citratado (citrato de sodio al 3,2%).

La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos. Si 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.

Si se utiliza plasma citratado, la sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células inmediatamente mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante debe extraerse cuidadosamente tras la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas. Se recomienda repetir los pasos de centrifugación y separación para minimizar la contaminación con plaquetas. Los trombocitos disueltos o deteriorados por el tiempo pueden producir resultados aberrantes. Si no se 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 anti- β_2 GPI IgM REAADS; véase una lista completa en la sección «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 μ l, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Frascos o botellas de 1 litro
- Lave los envases, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, con un sistema automático o semiautomático de lavado
- Guantes desechables
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble)
- Pipetas multicanal capaces de administrar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
- Tubos de microdilución y soporte de tubos de microdilución de 96 pocillos para diluciones de muestra y para la aplicación rápida a la placa de micropocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero o plasma y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones 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 μ l de agua para reactivos al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo de agua en cada placa.
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 automático de placas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de solución de lavado, la solución de sustrato puede desarrollar un color inconsistente.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de 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 microbiana y cruzada de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. No utilice componentes provenientes de equipos con diferentes números de lote.

Preparación del reactivo

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

Procedimiento del ensayo

1. El ensayo puede realizarse con una calibración de un solo punto (calibrador 2) o una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3 más el diluyente de muestras o el reactivo testigo como calibrador 4 igual a 0 unidades M). También se debe realizar un control con reactivo testigo con el método de calibración de un punto y con el multipuntual. Se añade al pocillo diluyente de muestras sin suero ni plasma. Este pocillo se trata de la misma forma que las muestras de control o de pacientes en los siguientes pasos del ensayo.
2. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
3. Prepare una dilución 1:50 de los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes en el diluyente de muestras (solución verde azulada); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 490 µl de diluyente de muestras 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. Incúbase 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 los pocillos 4 veces con solución de lavado. Cada pocillo debe llenarse con solución de lavado 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. Para retener los módulos de micropocillos durante el lavado, apriete el marco en las partes superior e inferior de los lados de mayor longitud. 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 solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana y HRP (roja) a los pocillos.
8. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe la solución de conjugado.
9. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo, como en el paso 6. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con toallas absorbentes tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
10. Añada 100 µl de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada el sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
11. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir el ácido a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se añadió el sustrato. El sustrato azul se volverá amarillo y la solución incolora permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a 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 medirse en los 5 minutos posteriores al añadido 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.

- Para obtener un valor de concentración de anticuerpos anti- β_2 GPI expresado en unidades M, multiplique la D.O. o los valores medios de la D.O. de cada uno de los controles y las muestras de los pacientes por el factor de conversión.

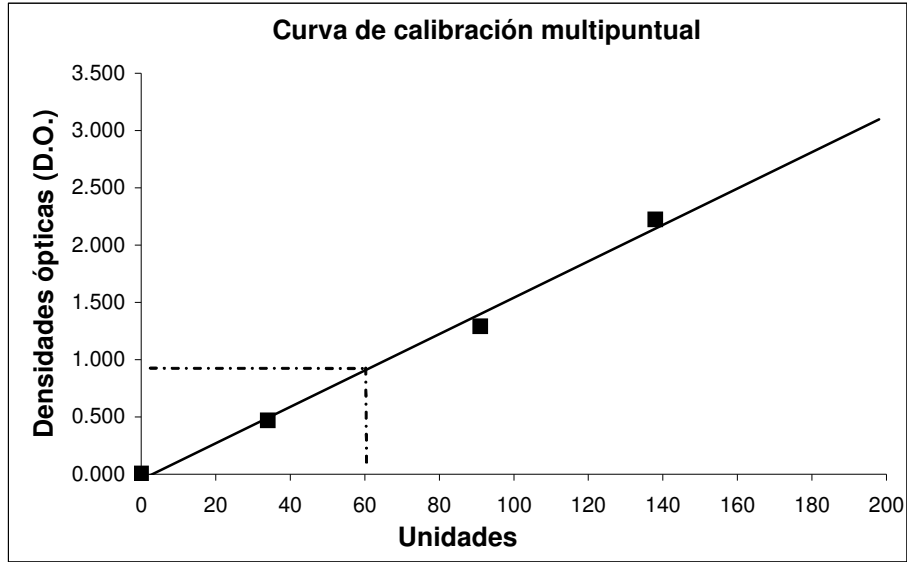
$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Concentración de anti-}\beta_2\text{GPI del calibrador 2}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 2 (D.O.)}}$$

$$\text{Concentración de anti-}\beta_2\text{GPI de la muestra} = \text{factor de conversión} \times \text{absorbancia (D.O.) de la muestra}$$

- El valor de conversión debe calcularse para el calibrador 2 en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo, los resultados obtenidos no serán válidos.

Curva de calibración multipuntual

- Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados del calibrador 3, los controles y las muestras de pacientes.
- Realice un análisis de regresión lineal con los cuatro valores del calibrador. (Véase en la etiqueta del frasco las unidades para M.) El calibrador 4 (diluyente de muestras) es igual a 0 unidades M respecto a las D.O. medias de cada calibrador.
- La curva del calibrador puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas. Para evitar los valores negativos, se recomienda utilizar una intersección en cero al generar la línea de regresión. Si no se dispone de esta opción, los valores negativos se indicarán como ceros. Cuando se genera la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados utilizando una intersección de cero.
- Determine los valores de la muestra de controles y pacientes obtenidos a partir de la curva del calibrador.
- Ejemplo de calibración con curva multipuntual.



Usando la curva de calibración suministrada, la D.O. de una muestra de 0,860 a 450 nm correspondería a un valor calculado de 60 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 0,050 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,050 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
3. Los valores de anti- β_2 GPI obtenidos con el suero control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del frasco. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Los valores de la D.O. de los duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios valores umbral para la población de pacientes correspondiente.
6. Las muestras con valores de anti- β_2 GPI de más de 200 unidades M pueden especificarse como «más de 200 unidades M».
7. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

RANGO NORMAL

Se comprobaron los anticuerpos IgM anti- β_2 GPI de las muestras de suero de 120 donantes de sangres sanos. Se estableció el siguiente rango normal:

- Menos de 20 unidades M

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos anti- β_2 GPI obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Si los hallazgos clínicos indican la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y el paciente resulta negativo para los anticuerpos anti- β_2 GPI, algunos investigadores recomiendan analizar la presencia de anticuerpos anticardiolipina, anticuerpos antifosfatidilserina y anticoagulante lúpico para confirmar el resultado negativo. Un paciente puede considerarse positivo para los anticuerpos antifosfolipídicos si se obtienen resultados positivos en una o en todas las pruebas.

Garantía

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

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

REAADS®
IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

Per uso diagnostico *in vitro*

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgM anti-beta 2-glicoproteina I (β_2 GPI) nel siero umano o nel plasma citrato (3,2% di citrato di sodio).

USO PREVISTO

L'individuazione e la determinazione semiquantitativa di anticorpi IgM anti- β_2 GPI 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. I campioni diluiti di siero o di plasma, sieri di calibrazione e controlli vengono incubati in micropozzetti rivestiti di β_2 GPI umana purificata. L'incubazione permette agli anticorpi anti- β_2 GPI 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 IgM umana, marcati con perossidasi di rafano, (HRP) vengono aggiunti per formare dei complessi con gli anticorpi legati alla β_2 GPI. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene dosato mediante aggiunta di una singola soluzione contenente tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H_2O_2) come substrato cromogeno. Il colore si sviluppa nei pozzetti ad una intensità proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti- β_2 GPI nel siero.

I risultati si ottengono leggendo in uno spettrofotometro la densità ottica (o assorbanza) di ciascun pozzetto. Viene fornito un siero calibratore con la concentrazione di anticorpi IgM anti- β_2 GPI espressa in unità M. L'utente può usare un calibratore a punto singolo o una curva di calibrazione a quattro punti. Quando si esegue la calibrazione a punto singolo, per ricavare un fattore di conversione basta dividere il valore di concentrazione dei sieri di calibrazione per il valore di densità ottica del calibratore. I valori di densità ottica degli altri campioni moltiplicati per un fattore di conversione permettono di ottenere le concentrazioni di anticorpi IgM anti- β_2 GPI espresse in unità M. 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 controlli e i risultati del campione del paziente sono determinati dalla curva di calibrazione.

REAGENTI

Conservare a 2 - 8°C. Non congelare.

Ciascun kit REAADS per il dosaggio della IgM anti- β_2 GPI a 96 pozzetti contiene i seguenti reagenti (i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit).

- 12x8 micropozzetti rivestiti di β_2 GPI stabilizzata (da siero umano), con bordo. (12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml di diluente per campioni IV (soluzione blu-verde). (Sample Diluent IV)
- 3 fiale (0,250 ml) di siero* di calibrazione IgM β_2 GPI (1-alto, 2-moderato, 3-basso) (umano); vedere l'etichetta delle fiale per la concentrazione di anticorpi in unità M. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo. (IgM Calibrator 1, IgM Calibrator 2, IgM Calibrator 3)
- 0,250 ml di siero* di controllo positivo IgM β_2 GPI (umano); vedere l'etichetta sulla fiala per l'intervallo M atteso. (IgM Positive Control)

- 0,250 ml di siero* di controllo normale (umano); vedere l'etichetta della fiala per il range previsto in unità M. (IgM Normal Control)
- 15 ml di soluzione di anticorpi (ovini) anti-IgM umana coniugati con HRP-(soluzione rossa). (IgM HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml di soluzione di substrato monocomponente (TMB e H₂O₂); pronta 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/Tween). (Wash Concentrate PBS/Tween (33x))

***ATTENZIONE - Contiene sodio azide**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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 gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si manipolano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante. È stato riportato che la sodio azide, a contatto con rame o piombo, può formare azidi metalliche. Tali azidi metalliche sono esplosive. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere eliminate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
6. La soluzione di substrato monocomponente può essere irritante per gli occhi e 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

Come matrice dei campioni, usare siero o plasma citrato (3,2% di citrato di sodio).

Il sangue va prelevato per venipuntura e il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo coagulazione. Se non devono essere analizzati 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. I campioni contenenti particelle visibili devono essere centrifugati prima del test.

Quando si usa il plasma citrato, il sangue va prelevato per venipuntura ed il plasma separato immediatamente dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione a 1500 g per 10 minuti. Il sopranatante va tolto con grande attenzione dopo centrifugazione per evitare contaminazione con le piastrine. Si consiglia di ripetere più di una volta i procedimenti di centrifugazione e separazione al fine di minimizzare la contaminazione da piastrine. Le piastrine lisate o invecchiate possono dar luogo ad artefatti. 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 il dosaggio di IgM anti- β_2 GPI; per un elenco completo, vedere la sezione "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 μ l, con punte appropriate
- Vetreria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beute o flaconi da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con punta parzialmente tagliata per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per lettura di piastre in grado di leggere l'assorbanza a 450 nm (650 nm standard per fascio doppio)
- Pipette multicanale per il dosaggio simultaneo in 8 pozzetti
- Provette per microdiluzione e portaprovette per microdiluzione in 96 pozzetti per la diluizione dei campioni e la dispensazione rapida alla piastra di pozzetti

Note procedurali

1. Portare i campioni di siero o di plasma e i reagenti a temperatura ambiente a mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni ed i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e del siero o plasma da analizzare vanno eseguite immediatamente prima 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 μ l 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. Si può usare anche un sistema di lavaggio della piastra automatico.
5. **IMPORTANTE:** se non si rimuovono adeguatamente eventuali residui di soluzione di lavaggio, la soluzione di substrato potrebbe sviluppare un colore non uniforme.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale 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. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. 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. Le temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26°C) possono contribuire a dar luogo a risultati errati.
11. Quando si aprono le fiale originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione crociata e batterica dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
13. Non utilizzare componenti di kit appartenenti a lotti differenti.

Preparazione dei reagenti

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

Procedura di analisi

1. Il dosaggio può essere eseguito con una calibrazione a punto singolo (calibratore 2) o con una curva di calibrazione a quattro punti (calibratori 1, 2 e 3, più diluente per campioni/bianco reagente come calibratore 4, pari a 0 unità M). Analizzare un bianco reagente di controllo sia con il metodo di calibrazione a punto singolo che con il metodo di calibrazione a più punti. Dispensare nel pozzetto il diluente per campioni senza siero o plasma. Questo pozzetto sarà trattato come un controllo o un campione prelevato dal paziente 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 1:50 dei calibratori, dei controlli e dei campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione (soluzione blu-verde); ad esempio: 10 µl di campione aggiunto a 490 µl di diluente per campione equivale ad una diluizione del campione pari a 1:50.
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 micropozzetti ed eliminare la soluzione di campione. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i campioni.
6. Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio. Per il lavaggio, ciascun pozzetto deve essere riempito con soluzione di lavaggio. 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 moduli dei micropozzetti durante il lavaggio, premere sul bordo superiore e inferiore dei lati più lunghi. Asciugare il liquido residuo picchiettando su carta assorbente. Evitare l'essiccazione dei pozzetti tra le varie fasi dell'analisi.
7. Aggiungere ai pozzetti 100 µl di soluzione (rossa) di anticorpi anti-IgM umane coniugati con HRP.
8. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti ed eliminare le soluzioni di coniugato.
9. Lavare 4 volte con soluzione di lavaggio, come indicato al passaggio 6. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con salviette assorbenti dopo l'ultimo lavaggio. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
10. Aggiungere 100 µl di substrato monocomponente in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
11. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) in ciascun pozzetto per fermare la reazione enzimatica. Assicurarsi di aggiungere l'acido ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità con cui è stato aggiunto il substrato. La soluzione di substrato blu diventa gialla, mentre la soluzione incolore rimane invariata. 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 di soluzione di arresto.

RISULTATI

Calibrazione a punto singolo

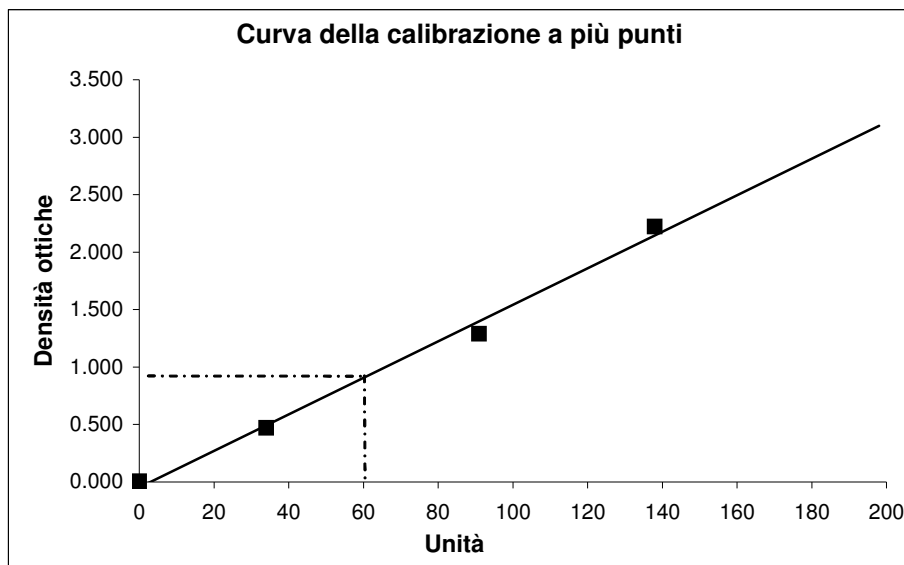
1. Se si sono analizzati il calibratore 2, i controlli e i campioni in duplicato, calcolare i valori medi di densità ottica.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione calibratore 2 (stampato sull'etichetta della fiala) per il valore di densità ottica o per il valore medio di densità ottica del siero di calibrazione.

- Per ottenere un valore di concentrazione di anticorpi anti- β_2 GPI espressa in unità M, moltiplicare per il fattore di conversione il valore di densità ottica o il valore medio di densità ottica di ciascun controllo e di ciascun campione prelevato dai pazienti.
- Il fattore di conversione va calcolato per il calibratore 2 in ogni test. Se si usa un fattore di conversione da un altro dosaggio, i risultati non saranno validi.

$\text{Fattore di conversione} = \frac{\text{Concentrazione di anti-}\beta_2\text{GPI del calibratore 2}}{\text{Valore di assorbanza del calibratore 2 (densità ottica)}}$ $\text{Concentrazione di anti-}\beta_2\text{GPI nel campione} = \text{Fattore di conversione} \times \text{Assorbanza del campione (DO)}$
--

Calibrazione con curva a più punti

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



Usando la curva di calibrazione esemplificativa fornita, una densità ottica del campione pari a 0,860 a 450 nm corrisponderebbe a un valore calcolato pari a 60 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 taratura dello spettrofotometro sul pozzetto bianco, la densità ottica del calibratore 4 o del bianco reagente deve essere inferiore a 0,050. Valori più alti di 0,050 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori di anti- β_2 GPI ottenuti per i sieri di controllo devono essere compresi negli intervalli indicati sulle etichette dei flaconi. Piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range sono accettabili.
4. I valori della densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni dei pazienti devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per i campioni con valori di assorbanza superiori a 0,200.
5. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare i propri valori di cut-off per una determinata popolazione di pazienti.
6. I campioni con valori di anti- β_2 GPI superiori a 200 unità M possono essere riportati come "superiori a 200 unità M".
7. Assicurarsi che tutti i parametri del controllo di qualità siano stati osservati prima di refertare i risultati delle analisi.

VALORI DI RIFERIMENTO

Per gli anticorpi IgM anti- β_2 GPI, sono stati analizzati campioni di siero da 120 donatori di sangue sani. Sono stati stabiliti i seguenti range normali:

- Meno di 20 unità M

LIMITI DEL TEST

Le concentrazioni di anticorpi anti- β_2 GPI ottenute con questo dosaggio sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altri procedimenti diagnostici. Se i risultati clinici indicano la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi mentre il paziente è negativo per gli anticorpi anti- β_2 GPI, alcuni ricercatori suggeriscono, per confermare il risultato negativo, di testare l'eventuale presenza di anticorpi anti-cardiolipina, di anticorpi anti-fosfatidilserina e di anticoagulante tipo lupus. Un paziente può essere considerato positivo per gli anticorpi antifosfolipidi se uno o tutti i test sono positivi.

Garanzia









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

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

REFERENCES

1. McNeil 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. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN. Anti-phospholipid 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* 1991; 87:4120-4124.
8. Galli M, Comfurius P, Maassen C. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *The Lancet* 1990; 335:1544-1547.
9. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *The Lancet* 1990; 336:177-178.
10. Roubey R. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39:1444-1454.
11. Wagenknecht D, McIntyre J. Changes in β_2 -Glycoprotein I antigenicity induced by phospholipid binding. *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 64:361-365.
12. Pengo V, Biasiolo A, Grazia Fior M. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β_2 -glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 73:29-34.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Tasuda T. Anticardiolipin antibodies recognize β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179:457-462.
14. Keil L, Galazka H, El-Kakdi HS. Binding of glycoprotein I to activated polystyrene and its recognition by human IgG autoantibodies. *Biotechnol Appl Biochem* 1995; 22:305-313.
15. Amengual O, Atsui T, Khamashta MA. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996; 35:1239-1243.
16. Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K. Antibodies to β_2 -glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39:1466-1474.
17. Lopez L, Dier K, Lopez D, Merrill J, Fink C. Anti- β_2 -Glycoprotein I and Antiphosphatidylserine Antibodies Are Predictors of Arterial Thrombosis in Patients With Antiphospholipid Syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004;121:142-149

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.

13038901 11
 Effective: 2008-01-11