



Anti- β_2 GP1 Antibody ELISA

IVD

CLIA Complexity: High
 CDC Analyte Identification Code: 0529
 CDC Test System Identification Code: 28484 (IgG), 28494 (IgM)

PRODUCT INSERT

REF 1152G Anti- β_2 -GP1 IgG ELISA 96 Determinations

REF 1152M Anti- β_2 -GP1 IgM ELISA 96 Determinations

An enzyme linked immunoassay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of IgG and IgM antibodies to β_2 -GP1, as an aid in assessing the risk of thrombosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) or lupus like disorders.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous group of autoantibodies against negatively charged phospholipids¹. They are detected primarily by the anti-cardiolipin antibody (ACA) test, the biological false positive test for syphilis or the lupus anticoagulant test. These three tests detect related, but not necessarily identical antibodies. Thus, more than one of these tests may be necessary to identify antiphospholipid antibodies.

Of the various tests for the detection of antiphospholipid antibodies, the anti-cardiolipin antibody test performed by ELISA is the most sensitive². The presence of anti-cardiolipin antibodies helps to identify patients at risk of venous and/or arterial thrombosis often accompanied by *thrombocytopenia*, a syndrome referred to as *antiphospholipid syndrome*¹⁻¹². It most commonly occurs in patients with *systemic lupus erythematosus* (SLE) or lupus-like disease where the criteria for SLE are not fulfilled⁵⁻⁷. High levels of anti-cardiolipin antibodies occur in thrombosis, fetal loss, *thrombocytopenia* and several other disorders¹⁻¹⁵. Anti-cardiolipin antibodies are routinely detected by ELISA, using cardiolipin as the antigen. Recent observations have indicated that 50kD serum factor is necessary for ACA to bind to cardiolipin. This co-factor was later identified as β_2 -GP1 (β_2 -glycoprotein I) or synonymously apolipoprotein H¹⁶⁻¹⁸. Though the function of β_2 -GP1 remains unclear it is certain that the presence of β_2 -GP1 facilitates the binding of the ACA to cardiolipin. Anti-cardiolipin antibodies, especially at low levels are found in a variety of clinical disorders unrelated to anti-phospholipid syndrome. ACA present in sera of patients with SLE and other autoimmune disorders is immunologically distinct from sera of patients with syphilis. The use of β_2 -GP1 protein as a replacement for cardiolipin antigen on the solid matrix, helps to make this distinction. Furthermore, anti- β_2 -GP1 antibodies are very specific for the anti-phospholipid syndrome.

PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay (ELISA) in β_2 -GP1 coated microwells. Controls, Calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated microwells to allow antibodies present in the serum to bind. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the microwells are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG or IgM conjugate to the microwells. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. Unbound enzyme-labeled conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of the pNPP substrate. The reaction is stopped and the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in enzyme units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁹. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to en-sure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

Materials provided

Immulin™ β₂-GP1 IgG ELISA [REF] 1152G

Immulin™ β₂-GP1 IgM ELISA [REF] 1152M

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Microplate with individual breakaway microwells coated with β ₂ -GP1 antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to β ₂ -GP1.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to β ₂ -GP1.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to β ₂ -GP1.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to β ₂ -GP1.
1 x 1.5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for β ₂ -GP1.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN₃

EN

† **REF** 1152G contains **B₂-GP1** IgG calibrators, controls and IgG conjugate

REF 1152M contains **B₂-GP1** IgM calibrators, controls and IgM conjugate

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

IVD In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

Materials Required But Not Provided

Pipette capable of dispensing 5 μ l and 1000 μ l

- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper

Automatic microplate washer capable of dispensing 200 μ l

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

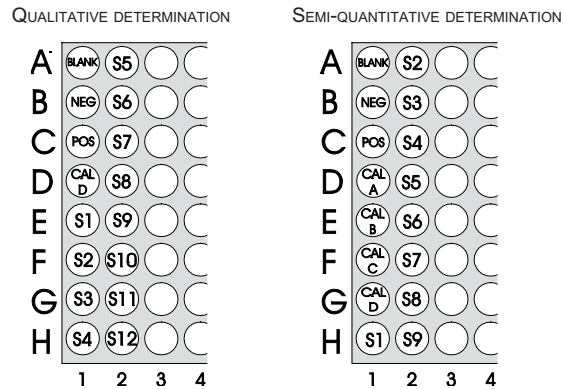
PROCEDURE

Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

Assay procedure

- ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
- Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
- Qualitative determination:** use only Calibrator D.
Semi-quantitative determination: use Calibrators A - D as shown in the ex-ample below.



- Prepare a 1:101** dilution of the patient specimen by mixing 5 μ l of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Add **100 μ l** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.
Note: Include one well with **100 μ l** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
- Incubate **30 minutes** (\pm 5 minutes) at room temperature on a level surface.
- Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300 μ l of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
- Add 100 μ l of the Conjugate to each well.
- Incubate the wells for **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Wash step: Repeat step 7.
- Add 100 μ l of Enzyme Substrate to each well.
- Incubate the wells for **30 minutes** (\pm 5 min) at room temperature.
- Add 100 μ l of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
- Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wave-length (405/630nm) microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3 . Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The Negative Control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. When

EN

performing qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the Negative Control and less than the absorbance of the Positive Control. For semi-quantitative determinations, the Positive Control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

Calibrator

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor. See sample standard curves (Figure 1) at the end of this document.

Interpretation

The information in Figure 2 at the end of this document serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuLisa™ Anti - β_2 -GP1 test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

Furthermore, a diagnosis cannot be made on the basis of anti - β_2 -GP1 results alone. The results of other laboratory tests and clinical findings must be considered. When a negative anti - β_2 -GP1 test occurs in the presence of clinical indications, a lupus anticoagulant test or other additional testing is recommended.

Expected Values

The incidence of anti β_2 -GP1 in SLE with thrombosis and pregnancy is summarized in the following table:

Incidence of ACA and Anti β_2 -GP1 Antibodies in SLE¹⁷

	ACA		Anti β_2 -GP1	
	IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
SLE	10	6	12	4
with thrombosis	24	14	27	14
no thrombosis	8	5	10	3
in pregnancy	12	7	15	7
with recurrent fetal loss	20	0	27	0
no fetal loss	11	7	14	7

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ anti- β_2 -GP1 IgG and IgM Antibody ELISA tests was determined by comparing the results with other commercially available anti- β_2 -GP1 IgG and IgM ELISA methods.

Normal Range: The normal range was established by testing 64 serum samples from apparently healthy donors obtained from the Red Cross. The mean plus three standard deviations of the mean of this normal population was used to determine the cut-off between normal and borderline positive individuals.

Comparative Specificity and Sensitivity:

Test results for the comparison between the Immulisa™ anti- β_2 -GP1 IgG and IgM Antibody tests and other commercially available assays for the same analytes appear in Tables 1 and 2 at the end of this document.

Cross-reactivity:

It is known that patients suffering from infectious diseases like syphilis have cardiolipin antibodies and lupus anti-coagulant. To test the clinical specificity of the assays, we tested sera from patients with syphilis for the presence of anti-cardiolipin and anti- β_2 -GP1 antibodies. The results appear below.

	# Tested	# Positive	% Positive
Anti-Cardiolipin (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anti-Cardiolipin (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

These studies suggest that β_2 -GP1 antibodies are more specific than anti-cardiolipin antibodies as only a small percentage of the patients with syphilis are positive for β_2 -GP1 antibodies.

Precision:

Two samples with known concentrations of anti β_2 -GP1 were assayed in 10 replicates over a two weeks period. Intra-and inter-assay coefficient of variation (CV) appear in tables 3 and 4 at the end of this document.

Recovery:

Three samples with known concentrations of anti - β_2 -GP1 were mixed with the appropriate dilutions of another positive sample with known levels of anti - β_2 -GP1. The anti - β_2 -GP1 values of the spiked samples were then determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results appear in tables 5 and 6 at the end of this document.



Μέθοδος ELISA για αντισώ ατα A -β₂ GP1

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1152G Μέ οδος E A για αντισώματα gG κατά της β₂-GP1 96 Προσδιορισμοί

REF 1152M Μέ οδος ELISA για αντισώματα Ig κατά της β₂-GP1 96 Προσδιορισμοί

Μια έθοδος ενζυ κού ανοσοπροσοφητικού προσδιορισ ού (ELISA) για την ανίχνευση και τον η ι-ποσοτικό προσδιορισ ό αντισω άτων IgG και IgM κατά της β₂-GP1 (β₂-γλυκοπρωτεΐνης 1), ως βοήθη α για την αξιολόγηση του κινδύνου θρό βωσης σε άτο α ε συστη ατικό ερυθη ατώδη λύκο (ΣΕΛ) ή ε διαταραχές παρό οιες ε λύκο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώ ατα είναι ία ετερογενής ο άδα αυτοαντισω άτων κατά αρνητικά φορτισ ένων φωσφολιπιδίων¹. Ανιχνεύονται κυρίως ε την ανάλυση αντισω άτων κατά της καρδιολιπίνης (ACA), τη βιολογικά ψευδώς θετική ανάλυση για σύφιλη και την ανάλυση για το αντιπηκτικό του λύκου. Αυτές οι τρεις δοκι ασίες ανιχνεύουν σχετιζό ένα, αλλά όχι απαραίτητα πανο ιότυπα αντισώ ατα. Συνεπώς, ενδέχεται να χρειαστούν περισσότερες από ία από αυτές τις αναλύσεις για να αναγνωριστούν τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώ ατα.

Από τις διάφορες αναλύσεις για την ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισω άτων, η ανάλυση αντισω άτων κατά της καρδιολιπίνης που εκτελείται ε ELISA είναι η πιο ευαίσθητη². Η παρουσία αντισω άτων κατά της καρδιολιπίνης συ βάλλει στην αναγνώριση ασθενών ε κίνδυνο φλεβικής και/ή αρτηριακής θρό βωσης, οι οποίες συχνά συνοδεύονται από ρομβοκυτταροπενία, ένα σύνδρο ο που αναφέρεται ως αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο¹⁻¹². Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρο ο ε φανίζεται συχνότερα σε ασθενείς ε συστηματικό ερυ ηματώδη λύκο (ΣΕΛ) ή παθήσεις παρό οιες ε λύκο στις οποίες δεν πληρούνται τα κριτήρια του ΣΕΛ⁵⁻⁷. Υψηλά επίπεδα αντισω άτων κατά της καρδιολιπίνης ε φανίζονται στη θρό βωση, στην αποβολή ε βρύου, στη ρομβοκυτταροπενία και αρκετές άλλες διαταραχές¹⁻¹⁵. Τα αντισώ ατα κατά της καρδιολιπίνης αναγνωρίζονται συνήθως ε τη έθοδο ELISA, η οποία χρησι οποιεί ως αντιγόνο την καρδιολιπίνη. Πρόσφατες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι για τη σύνδεση της καρδιολιπίνης είναι απαραίτητος ένας παράγοντας του ορού εγέθους 50 D. Αυτός ο συ παράγοντας αναγνωρίστηκε ως η β₂-GP1 (β₂-γλυκοπρωτεΐνη 1) ή απολιποπρωτεΐνη H¹⁶⁻¹⁸. Παρόλο που η λειτουργία της β₂-GP1 παρα ένει ασαφής, είναι βέβαιο ότι η παρουσία β₂-GP1 διευκολύνει τη σύνδεση των αντισω άτων ACA ε την καρδιολιπίνη. Τα αντισώ ατα κατά της καρδιολιπίνης, ειδικά σε χα ηλά επίπεδα, ανευρίσκονται σε διάφορες κλινικές διαταραχές οι οποίες δεν σχετίζονται ε το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρο ο. Τα ACA που υπάρχουν στον ορό ασθενών ε ΣΕΛ και άλλες αυτοάνοσες παθήσεις διαφέρουν ανοσολογικά από αυτά που υπάρχουν στον ορό ασθενών ε σύφιλη. Η χρήση της πρωτεΐνης β₂-GP1 ως αντικαταστάτη της καρδιολιπίνης στο στερεό στρώ α, συ βάλλει στην επίτευξη αυτού του διαχωρισ ού. Επιπλέον, τα αντισώ ατα κατά της β₂-GP1 είναι πολύ ειδικά για το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρο ο.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση εκτελείται ως ανοσοπροσοδιορισ ός στερεάς φάσης (ELISA) σε ικροκυψελίδες επικαλυ ένες ε β₂-GP1. Τα διαλύ ατα ελέγχου, οι βαθ ονο ητές και τα δείγ ατα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυ ένες ε το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσ ευση όλων των αντισω άτων του ορού. Τα αντισώ ατα που δεν δεσ εύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απο ακρύνονται ε έκπλυση των ικροκυψελίδων. Τα αντισώ ατα που δεσ εύτηκαν στις ικροκυψελίδες ανιχνεύονται ε την προσθήκη ενός συζευκτικού αντισώ ατος κατά της ανθρώπινης IgG ή IgM, ση ασ ένου ε ένζυ ο. Αυτά τα συζευγ ένα ε ένζυ ο αντισώ ατα δεσ εύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της αντίστοιχης τάξης. Το η δεσ ευ ένο συζευκτικό αντίσω α ε το ένζυ ο απο ακρύνεται ε έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρω α ενζύ ου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισω άτων ε την αλλαγή χρώ ατος που προκύπτει λόγω της εατροπής του υποστρώ ατος pNPP. Η αντίδραση τερ ατίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώ ατος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώ ατος, ανιχνεύεται ε φασ ατοφωτό ετρο, σε ήκος κύ ατος 405 nm. Τα αποτελέσ ατα εκφράζονται σε ονάδες ενζύ ου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζηλα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυπνύμενες κροκουπελίδων προορίζονται για άμεση χρήση.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιπόγωνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁹. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από ούλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος κροβιακής και χημικής όλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgG κατά της β₂-GP1 ImmuLisa™ REF 1152G

Μέθοδος ELISA για αντισώματα IgM κατά της β₂-GP1 ImmuLisa™ REF 1152M

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων κροκουπελίδων επικαλυπνύμενων με το αντιγόνο β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητής Α (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητής Β (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Έτοιμος προς χρήση Βαθμόνητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για τα β ₂ -GP1.

EL

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος πλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει ρ-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως .
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃


† **REF** Το kit 1152G περιλαμβάνει βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα IgG κατά της **B₂-GP1**

REF Το kit 1152M περιλαμβάνει βαθμονομητές, διαλύματα ελέγχου και συζευκτικό αντίσωμα IgM κατά της **B₂-GP1**

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου


 Η ερογενία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 l έως 1000 l

Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών

Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων

Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

Εύκαπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Χρονομετρητής

EL

- Απορροφητικό χαρτί
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη με τα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**
- Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σημάνετε το αρχείο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. **Ποιοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμονομητή D.
Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός: χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές A – D, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

EL

4. Προετοιμάστε για αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5** μ l του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
5. Προσθέστε **100** μ l βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε για κυψελίδα με **100** μ l αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριο. Η απορρόφηση αυτής της κυψελίδας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3.
6. Επωάστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναρροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300 μ l του **αναασυσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναρροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιηθεί ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε ένα απορροφητικό υλικό ώστε να αποκρυσταλλωθεί το υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.
8. Προσθέστε 100 μ l συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.
9. Επωάστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Στάδιο έκπλυσης: Επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 μ l ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επωάστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθέστε 100 μ l διαλύματος τερματισμού σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τερματισμού, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μιας ώρας από τον τερματισμό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας για συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος (405/630 nm), έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η έτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Όταν εκτελείτε ποιοτικούς προσδιορισμούς, η οπτική πυκνότητα του βαθμονομητή D θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν είτε από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή D = EU/ml του εξεταζόμενου δείγματος
Απ/ση του βαθμονομητή D

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθονοητών Α έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί εγγραφικών άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των Χ τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Υ την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησής τους.

Βαθονοητής

Οι βαθονοητές συπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθονοητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθονοησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσεως. Βλ. τυπικές καμπύλες δειγμάτων (Εικόνα 1) στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ερηνεία

Τα στοιχεία της εικόνας 2, στο τέλος αυτού του εντύπου, λειτουργούν όντως ως οδηγός για την ερηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 Immulisa™ δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιόλυση, σε ολυσμένο αίμα ή λιπαρά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου.

Επιπλέον, η διάγνωση δεν μπορεί να τεθεί μόνο με τα αποτελέσματα των αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1. Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα και άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και τα κλινικά ευρήματα. Όταν εμφανίζεται αρνητικό αποτέλεσμα στην ανάλυση αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1, παρουσία κλινικών ενδείξεων, συνιστάται η διενέργεια νέας ανάλυσης για το αντιπηκτικό του λύκου ή κάποιας άλλης πρόσθετης ανάλυσης.

Ανα ενόθενες τιμές

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζεται η συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 στο ΣΕΛ παρουσία θρόμβωσης και κατά την εγκυμοσύνη:

	Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων ACA και αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 σε ΣΕΛ ¹⁷			
	ACA		Αντισώματα κατά της β_2 -GP1	
	IgG	IgM	IgG	IgM
ΣΕΛ	%	%	%	%
παρουσία θρόμβωσης	10	6	12	4
απουσία θρόμβωσης	24	14	27	14
στην κύηση	8	5	10	3
παρουσία καθ'έξιν αποβολών	12	7	15	7
απουσία αποβολής εμβρύου	20	0	27	0
	11	7	14	7

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Προσδιορίστηκε η χρησιμότητα των αναλύσεων ELISA για αντισώματα IgG και IgM κατά της β_2 -GP1 Immulisa™, συγκρίνοντας τα αποτελέσματά της με άλλες μεθόδους ELISA για αντισώματα IgG και IgM κατά της β_2 -GP1, που διατίθενται στο εμπόριο.

Φυσιολογικό εύρος: Το φυσιολογικό εύρος καθορίστηκε με την ανάλυση 64 δειγμάτων ορού από φαινοεπικά υγιείς δότες που προήλθαν από τον Ερυθρό Σταυρό. Για τον προσδιορισμό της οριακής τιμής (cut-off) μεταξύ των φυσιολογικών και των οριακά θετικών ατόμων, χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή συν τρεις τυπικές αποκλίσεις της έσης τιμής αυτού του φυσιολογικού πληθυσμού.

EL

Συγκριτική ειδικότητα και ευαισθησία:

Στους πίνακες 1 και 2, στο τέλος αυτού του εντύπου, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των εξετάσεων για τη σύγκριση αναλύσεων για αντισώματα IgG και IgM κατά της β_2 -GP1 Immulisa™ με άλλες μεθόδους ανάλυσης που διατίθενται στο εμπόριο, οι οποίες χρησιμοποιούν τις ίδιες αναλυτικές ουσίες.

Διασταυρούμενη αντίδραση:

Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς που πάσχουν από λοιμώδη νοσήματα, όπως η σύφιλη, εμφανίζουν αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης και αντιπηκτικό του λύκου. Για να ελεγχθεί η κλινική ειδικότητα αυτών των αναλύσεων, εξετάστηκαν οροί ασθενών με σύφιλη για παρουσία αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης και κατά της β_2 -GP1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

	Αριθμός ορών που εξετάστηκαν	Αριθμός θετικών ορών	Ποσοστό θετικών ορών %
Αντισώματα IgG κατά της καρδιολιπίνης (ACA)	49	49	100
Αντισώματα IgG κατά της β_2 -GP1	49	2	4
Αντισώματα IgM κατά της καρδιολιπίνης (ACA)	50	17	34
Αντισώματα IgM κατά της β_2 -GP1	50	4	8

Αυτές οι ελέγχες υποδεικνύουν ότι τα αντισώματα κατά της β_2 -GP1 είναι πιο ειδικά από τα αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης, καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών με σύφιλη βρέθηκαν θετικοί για αντισώματα κατά της β_2 -GP1.

Ακρίβεια:

Αναλύθηκαν δύο δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 σε 10 αντίγραφα σε μια περίοδο δύο εβδομάδων. Οι συντελεστές ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών παρουσιάζονται στους πίνακες 3 και 4, στο τέλος αυτού του εντύπου.

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος με γνωστά επίπεδα αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1. Προσδιορίστηκαν οι τιμές των αντισωμάτων κατά της β_2 -GP1 των αναμειγθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επίδοση ανάκτησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6, στο τέλος αυτού του εντύπου.



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para anticuerpos anti- β_2 GP1

IVD

PROSPECTO

REF 1152G ELISA Anti- β_2 -GP1 IgG 96 an lisis

REF 1152M ELISA Anti- β_2 -GP1 IgM 96 an lisis

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semi cuantificación de anticuerpos de clase IgG e IgM anti β_2 -GP1, como ayuda en la comprobación del riesgo de trombosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o trastornos asimilables al lupus.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antifosfolípidos son un grupo heterogéneo de auto anticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa ¹. Los métodos fundamentales de detección son el ensayo de anticuerpos anti-cardiolipina (ACA), el análisis biológico falsamente positivo de sífilis y el ensayo de lupus anticoagulante. Estos tres análisis detectan anticuerpos emparentados pero no necesariamente idénticos, razón por la que a veces es necesario efectuar más de uno de estos ensayos para identificar los anticuerpos antifosfolípidos.

De los diferentes análisis para detectar anticuerpos antifosfolípidos, el más sensible es el de anticuerpos anti-cardiolipina efectuado mediante ELISA ². La presencia de anticuerpos anti-cardiolipina es una herramienta eficaz para identificar a pacientes con riesgo de trombosis venosa o arterial, frecuentemente acompañada de trombocitopenia, denominada síndrome antifosfolípidos¹⁻¹². *Este síndrome se presenta con mayor frecuencia en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o patologías similares al lupus que no cumplen con los criterios del LES*⁵⁻⁷. Niveles elevados de anticuerpos anticardiolipina se registran en trombosis, pérdida del feto, trombocitopenia y varias otras patologías¹⁻¹⁵. En rutina, los anticuerpos anticardiolipina se detectan mediante ELISA utilizando como antígeno la cardiolipina. Estudios recientes indican que para que los ACA se unan a la cardiolipina es necesario un factor sérico de 50kD; este co-factor se identificó como β_2 -GP1 (β_2 -glicoproteína I) o también apolipoproteína H¹⁶⁻¹⁸. Si bien la función de β_2 -GP1 todavía no es clara, lo cierto es que la presencia de β_2 -GP1 facilita la unión de los ACA a la cardiolipina. Los anticuerpos anticardiolipina, especialmente en niveles bajos, están presentes en una variedad de trastornos clínicos sin relación con el síndrome antifosfolípidos. El ACA presente en el suero de pacientes con LES y otras patologías autoinmunes es inmunológicamente diferente del suero de pacientes con sífilis. El empleo de la proteína β_2 -GP1 como sustituto del antígeno cardiolipina en la matriz sólida ayuda a distinguirlos. Además, los anticuerpos anti β_2 -GP1 son muy específicos del síndrome antifosfolípidos.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA) efectuado en micropocillos recubiertos de β_2 -GP1. Controles, calibradores y muestra diluida de suero del paciente se incuban en los pocillos recubiertos de antígeno permitiendo que los anticuerpos presentes en el suero se unan. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan mediante un conjugado de IgG o IgM antihumano marcado con un enzima añadido a los pocillos. Estos anticuerpos conjugados con enzima se unen específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase respectiva. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro se lee la intensidad del cambio de color a 405nm, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad. Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Para diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹⁹. ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para el almacenamiento, el empaquetado y el etiquetado, consulte el prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA β_2 -GP1 IgG Immulisa™ REF 1152G

ELISA β_2 -GP1 IgM Immulisa™ REF 1152M



Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Microplaca con micropocillos individuales separables revestidos con antígeno β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 †	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano que contiene anticuerpos β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 †	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano que contiene anticuerpos β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 †	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano que contiene anticuerpos β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 †	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano que contiene anticuerpos β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 †	Control Positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Suero humano positivo a anticuerpos anti β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Control Negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS †	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS †	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0.1% NaN₃

† REF 1152G contiene calibradores IgG β_2 -GP1, controles con conjugado IgG

REF 1152M contiene calibradores IgM β_2 -GP1, controles y conjugado IgM

Símbolos utilizados en las etiquetas: N.º de lote N.º de catálogo Fecha de caducidad Temperatura de conservación Léanse las instrucciones de uso Para diagnóstico *in vitro* Fabricante N.º de análisis**Materiales necesarios no suministrados**

Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl

- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido.
- Temporizador
- Papel absorbente

La adición automática de microplacas con capacidad de 100 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interfieren en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO**Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) durante 30 minutos antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- **Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice ciérrelas herméticamente para reducir al máximo la exposición al vapor de agua.**
- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El periodo de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Se ale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
3. **Determinación cualitativa:** use únicamente el Calibrador D. **Determinación semi cuantitativa:** use los Calibradores A - D como se muestra en el ejemplo siguiente.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **0.5 ml** de diluyente de suero.
5. Añada **100 µl** de calibradores, controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los respectivos pocillos como se indica en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con 100 µl de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** (± 5 minutos) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Fase de lavado: aspire totalmente el contenido de cada pocillo. Añada $\mu 00-300$ µl de tampón de lavado reconstituido en todos los pocillos y aspire. Repita el procedimiento tres veces más hasta completar cuatro lavados. Después del último lavado, invierta la placa y sacúdala sobre material absorbente para eliminar todo residuo de líquido. No seque completamente los pocillos.
8. Añada 100 µl de conjugado en cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Fase de lavado: repita el punto 7.
11. Añada 100 µl de sustrato enzimático a cada pocillo.
12. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. Añada 100 µl de solución Stop a cada pocillo. Mantenga la misma secuencia de tiempos de solución Stop utilizados para el sustrato enzimático. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora después de haber detenido la reacción.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble comparándolo con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser

<0,3. La lectura de absorbancia del calibrador A debe ser >1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

_____ X EU/ml de Calibrador D= EU/ml muestra analizada

Abs. de Calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que estén dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución. En la figura 1 al final de este documento se muestran ejemplos de curvas estándar.

Interpretación

La información de la figura 2 al final de este documento tiene sólo valor de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En ensayo Anti - β_2 -GP1 ImmuLisa™ no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano.

Los resultados obtenidos con la prueba anti - β_2 -GP1 son una herramienta más de diagnóstico y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos, sino que se han de ponderar junto con los resultados de otros análisis de laboratorio y las condiciones clínicas del paciente. Ante un resultado negativo del análisis anti - β_2 -GP1 en presencia de indicaciones clínicas, se aconseja efectuar un análisis adicional de lupus anticoagulante u otros análisis.

VALORES ESPERADOS

La incidencia de anti β_2 -GP1 en LES con trombosis y embarazo se resume en la siguiente tabla:

Incidencia de anticuerpos ACA y Anti β_2 -GP1 en LES¹⁷

	ACA		Anti β_2 -GP1	
	IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
LES	10	6	12	4
con trombosis	24	14	27	14
sin trombosis	8	5	10	3
en el embarazo	12	7	15	7
con repetida pérdida del feto	20	0	27	0
sin pérdida del feto	11	7	14	7

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La utilidad del ensayo ELISA para anticuerpos anti- β_2 -GP1 IgG e IgM Immulisa™ se determinó comparando los resultados con otros métodos ELISA anti- β_2 -GP1 IgG e IgM disponibles en comercio.

Valores normales: los valores normales se determinaron analizando 64 muestras de suero de donantes sanos. Para establecer el límite entre individuos normales y borderline positivos se aplicó la media más tres desviaciones estándar de esta población normal.

Especificidad y sensibilidad comparadas:

En las tablas 1 y 2 al final de este documento se muestran los resultados de la comparación entre el análisis de anticuerpos anti- β_2 -GP1 IgG e IgM Immulisa™ y otro ensayo disponible en comercio.

Reactividad cruzada:

Es sabido que los pacientes con enfermedades infecciosas tales como tienen anticuerpos cardiolipina y lupus coagulante. Para probar la especificidad clínica de los análisis, en suero de pacientes con sífilis se efectuaron ensayos de anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β_2 -GP1. Los resultados se muestran a continuación:

	# Analizados	# Positivos	% Positivos
Anti-cardiolipina (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anti-cardiolipin (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

Estos estudios indican que los anticuerpos β_2 -GP1 son más específicos que los anti-cardiolipina, puesto que sólo un pequeño porcentaje de pacientes con sífilis son positivos a los anticuerpos β_2 -GP1.

Precisión:

Los coeficientes de variación (CV) intra ensayo e interensayo de se anti β_2 -GP1 calcularon sobre la base de 10 repeticiones en un período de dos semanas. Los resultados se presentan en las tablas 3 y 4 al final de este documento.

Recuperación:

Tres muestras con concentraciones conocidas de anti - β_2 -GP1 se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con niveles conocidos de anti - β_2 -GP1. Se determinaron los valores de anti - β_2 -GP1 de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados se presentan en las tablas 5 y 6 al final de este documento.



Anti- β_2 -GP1 Antikörper-ELISA

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1152G β_2 -GP1-IgG-ELISA 96 Bestimmungen

REF 1152M β_2 -GP1-IgM-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen β_2 -GP1 als Hilfsmittel bei der Bewertung des Thromboserisikos bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder Lupus-ähnlichen Krankheiten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Anti-Phospholipid-Antikörper sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern gegen negativ geladene Phospholipide¹. Sie werden hauptsächlich mit Hilfe des Anti-Cardiolipin-Antikörpertests (ACA), des biologischen falsch positiven Syphilitests oder des Lupus-Antikoagulant-Tests nachgewiesen. Diese drei Tests weisen verwandte, aber nicht unbedingt identische Antikörper nach. Daher ist mindestens einer dieser Tests erforderlich, um Anti-Phospholipid-Antikörper zu identifizieren.

Unter den verschiedenen Tests für den Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern hat der mit der ELISA-Methode durchgeführte Anti-Cardiolipin-Antikörpertest die größte Sensitivität². Das Vorhandensein von Anti-Cardiolipin-Antikörpern hilft dabei, Patienten zu identifizieren, bei denen die Gefahr einer venösen und/oder arteriellen Thrombose, oftmals begleitet von einer *thrombozytopenie*, besteht; dieses Syndrom wird als *Antiphospholipid-Syndrom* bezeichnet¹⁻¹². Es tritt am häufigsten bei Patienten mit *systemischem Lupus erythematoses* (SLE) oder mit Lupus-ähnlichen Krankheiten, bei denen die SLE-Kriterien nicht erfüllt sind, auf⁵⁻⁷. Ein hoher Spiegel von Anti-Cardiolipin-Antikörpern tritt bei Thrombose, Fehlgeburten, *thrombozytopenie* und mehreren anderen Krankheiten auf¹⁻¹⁵. Anti-Cardiolipin-Antikörper werden routinemäßig mit ELISA unter Verwendung von Cardiolipin als Antigen nachgewiesen. Neuere Beobachtungen haben gezeigt, dass für die Bindung von ACA an Cardiolipin 50 kD Serumfaktor erforderlich sind. Dieser Kofaktor wurde später als β_2 -GP1 (β_2 -Glykoprotein I), auch Apolipoprotein H genannt, identifiziert¹⁶⁻¹⁸. Obwohl seine genaue Funktion unklar bleibt, ist es sicher, dass das Vorhandensein von β_2 -GP1 die Bindung von ACA an Cardiolipin erleichtert. Insbesondere in niedrigen Konzentrationen werden Anti-Cardiolipin-Antikörper bei einer Vielzahl von klinischen Erkrankungen, die nicht mit dem Antiphospholipid-Syndrom in Verbindung stehen, aufgefunden. ACA im Serum von Patienten mit SLE und anderen Autoimmunkrankheiten unterscheidet sich immunologisch vom Serum von Patienten mit Syphilis. Die Verwendung des β_2 -GP1-Proteins als Ersatz für das Cardiolipin-Antigen auf der festen Matrix hilft dabei, diese Unterscheidung zu treffen. Außerdem sind Anti- β_2 -GP1-Antikörper sehr spezifisch für das Antiphospholipid-Syndrom.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasen-Immuntest in β_2 -GP1-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefungen durchgeführt. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies erlaubt die Bindung der im Serum vorhandenen Antikörper. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. An die Vertiefungen gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG- oder Anti-Human-IgM-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das humane Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nicht gebundenes enzymmarkiertes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzimeinheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

DE

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁹. **WARNUNG** Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten.

Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

Mitgeliefertes Material

ImmulinTM β₂-GP1-IgG-ELISA REF 1152G

ImmulinTM β₂-GP1-IgM-ELISA REF 1152M

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit β ₂ -GP1 -Antigen beschichtet.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüneappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lilaappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaueappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbeappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>roteappe</i>). Enthält β ₂ -GP1-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weißeappe</i>). Enthält Humanserum.

DE

1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverd nner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht sch t en .
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stoppl sung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN₃

† **REF** 1152G enthält B₂-**GP1**-IgG-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgG-Konjugat.

REF 1152M enthält B₂-**GP1**-IgM-Kalibratoren und -Kontrollseren sowie IgM-Konjugat.

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
 - Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
 - Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
 - Entionisiertes oder destilliertes Wasser
 - Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
 - Spritzflasche f r den verd nnten Waschpuffer
 - Stoppuhr
 - Saugfähiges Papier
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von –00 l

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell

verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschrift: Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeiträume beginnen nach der Verteilung der Reagenzien.

Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN M SSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. **Qualitative Bestimmung:** Verwenden Sie nur Kalibrator D.
Semi-quantitative Bestimmung: Verwenden Sie Kalibratoren A-D wie im untenstehenden Beispiel gezeigt.

QUALITATIVE BESTIMMUNG		SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG	
A	BLANK \$5	A	BLANK \$2
B	NEG \$6	B	NEG \$3
C	POS \$7	C	POS \$4
D	CAL D \$8	D	CAL A \$5
E	\$1 \$9	E	CAL B \$6
F	\$2 \$10	F	CAL C \$7
G	\$3 \$11	G	CAL D \$8
H	\$4 \$12	H	\$1 \$9
	1 2 3 4		1 2 3 4

4. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.
5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die Extinktion dieser Vertiefung sollte nicht über 0,3 liegen.
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.

DE

7. Waschschritt: Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 0-300 µl des **rekonstituierten** Waschpuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte weitere drei Male, bis Sie insgesamt vier Mal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.
8. Geben Sie 100 µl Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
10. Waschschritt: Wiederholen Sie Schritt 7.
11. Geben Sie 100 µl Enzymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
13. Geben Sie 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung. Bewahren Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enzymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde nach dem Stoppen der Reaktion bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer einzelnen oder doppelten (405/630 nm) Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei qualitativen Bestimmungen muss der Extinktionswert von Kalibrator D über dem Wert des negativen Kontrollserums und unter dem Wert des positiven Kontrollserums liegen. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml Testprobe}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

Kalibrator

Die Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve

DE

fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren. Siehe die Beispiele für Standardkurven (Abb. 1) am Ende dieses Dokuments.

Interpretation

Die in Abb. 2 am Ende dieses Dokuments enthaltenen Informationen dienen nur als Richtlinie für die Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ Anti- β_2 -GP1-Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen.

Außerdem kann eine Diagnose nicht allein aufgrund der Ergebnisse des Anti- β_2 -GP1-Tests gestellt werden. Die Ergebnisse anderer Labortests und die klinischen Befunde müssen berücksichtigt werden. Falls das Ergebnis des Anti- β_2 -GP1-Tests negativ ist, obwohl klinische Indikationen vorliegen, werden ein Lupus-Antikoagulanz-Test oder andere zusätzliche Tests empfohlen.

Erwartete Werte

Die Häufigkeiten von Anti- β_2 -GP1 bei SLE mit Thrombose und Schwangerschaft sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

	ACA		Anti- β_2 -GP1	
	IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
SLE	10	6	12	4
mit Thrombose	24	14	27	14
ohne Thrombose	8	5	10	3
bei Schwangerschaft	12	7	15	7
bei wiederholten Fehlgeburten	20	0	27	0
ohne Fehlgeburten	11	7	14	7

LEISTUNGSMERKMALE

Die Nützlichkeit der ImmuLisa™ Anti- β_2 -GP1-IgG- und -IgM-Antikörper-ELISA-Tests wurde durch Vergleich mit den Ergebnissen anderer im Handel erhältlicher Anti- β_2 -GP1-IgG- und -IgM-ELISA-Methoden bestimmt.

Normalbereich: Der Normalbereich wurde bestimmt, indem 64 vom Roten Kreuz erhaltene Serumproben von anscheinend gesunden Spendern getestet wurden. Der Durchschnitt plus drei Standardabweichungen vom Durchschnitt dieser normalen Bevölkerung wurde verwendet, um die Trennlinie zwischen normalen und grenzwertig positiven Personen festzulegen.

Vergleichende Spezifität und Sensitivität

Die Testergebnisse für den Vergleich zwischen den ImmuLisa™ Anti- β_2 -GP1-IgG- und -IgM-Antikörper-Tests und anderen im Handel erhältlichen Tests für die gleichen Analyten sind in Tabellen 1 und 2 am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Kreuzreaktivität:

Es ist bekannt, dass Patienten mit ansteckenden Krankheiten wie Syphilis Cardiolipin-Antikörper und Lupus-Antikoagulans aufweisen. Um die klinische Spezifität der Tests zu überprüfen, haben wir Seren von Patienten mit

DE

Syphilis auf das Vorhandensein von Anti-Cardiolipin- und Anti- β_2 -GP1-Antikörper getestet. Die Ergebnisse sind unten angezeigt.

	# getestet	# positiv	% positiv
Anti-Cardiolipin (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anti-Cardiolipin (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

Diese Studien legen nahe, dass β_2 -GP1-Antikörper spezifischer sind als Anti-Cardiolipin-Antikörper, da nur bei einem geringen Anteil der Patienten mit Syphilis positive Ergebnisse für β_2 -GP1-Antikörper auftraten.

Genauigkeit:

Zwei Proben mit bekannter Konzentration von Anti- β_2 -GP1 wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen in 10 Wiederholungen getestet. Die intraserialen und interserialen Variationskoeffizienten (VK) sind in Tabellen 3 und 4 am Ende dieses Dokuments angezeigt.

Wiederfindung:

Drei Proben mit bekannten Konzentrationen von Anti- β_2 -GP1 wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an Anti- β_2 -GP1 gemischt. Die Anti- β_2 -GP1-Werte der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabellen 5 und 6 am Ende dieses Dokuments angezeigt.



Anticorps anti- β_2 GP1 ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1152G β_2 -GP1 IgG ELISA 96 Tests

REF 1152M β_2 -GP1 IgM ELISA 96 Tests

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection et la quantification des anticorps IgG et IgM anti- β_2 -GP1, servant de support dans l'évaluation du risque de thrombose chez des patients souffrant de lupus érythémateux systémique (SLE) ou des maladies à effet lupus.

RESUME ET EXPLICATION

Les anticorps antiphospholipides sont un groupe hétérogène d'auto-anticorps contre les phospholipides négativement chargés¹. Ils sont essentiellement détectés par le test anticorps anti-cardiolipide (ACA), le faux positif biologique pour la syphilis ou le test du lupus anticoagulant. Ces trois tests détectent des anticorps apparentés, mais non nécessairement identiques. Par conséquent, plus d'un de ces tests peut s'avérer nécessaire pour identifier les anticorps antiphospholipides.

Des différents tests servant à la détection d'anticorps antiphospholipides, le test de l'anticorps anti-cardiolipide réalisé par ELISA est le plus sensible². La présence d'anticorps anti-cardiolipide permet d'identifier des patients exposés à des risques de thrombose veineuse et/ou artérielle, accompagnée de thrombocytopénie, un syndrome connu sous le nom de *syndrome des antiphospholipides*¹⁻¹². Il se produit le plus communément chez les patients présentant un lupus érythémateux systémique (SLE) ou des maladies à effet lupus pour lesquels les critères de SLE ne sont pas réunis⁵⁻⁷. Des niveaux élevés d'anticorps anti-cardiolipide se manifestent dans la thrombose, la mortalité embryonnaire, la thrombocytopénie et plusieurs autres maladies¹⁻¹⁵. Les anticorps anti-cardiolipide sont bien détectés par la méthode ELISA, en utilisant le cardiolipide comme antigène. De récentes observations ont indiqué que le facteur sérique 50kD est nécessaire à l'ACA pour s'agglutiner avec le cardiolipide. Ce cofacteur a été identifié plus tard comme β_2 -GP1 (β_2 Glycoprotéine I) ou son synonyme apolipoprotéine H¹⁶⁻¹⁸. Bien que la fonction de β_2 -GP1 demeure encore mal connue, il est certain que la présence de β_2 -GP1 facilite l'agglutination de l'ACA au cardiolipide. Les anticorps anti-cardiolipide, surtout à de faibles niveaux se retrouvent dans un grand nombre d'affections cliniques qui sont sans rapport avec le syndrome anti-phospholipide. L'ACA présent dans le sérum des patients atteints de SLE et des autres désordres auto-immuns est distinct du point de vue immunologique du sérum des patients atteints de syphilis. Le recours à la protéine β_2 -GP1 comme substitut de l'antigène cardiolipide sur la matrice solide aide à faire cette distinction. En outre, les anticorps anti- β_2 -GP1 sont très spécifiques pour le syndrome anti-phospholipide.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le test est exécuté sous la forme d'une méthode immuno-enzymatique (solid phase enzyme labeled immunosorbent assay - ELISA) dans des microplaques à puits enduites de β_2 -GP1. Les régulateurs, les étalons et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps liés aux micropuits sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps marqué enzymatique pour l'IgG ou IgM humain aux puits. Ces anticorps secondaires conjugués à une enzyme se lient de manière spécifique à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Le conjugué non-lié est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat spécifique (pNPP) sont ensuite ajoutés aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat pNPP. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités enzyme par millilitre (EU/ml).

REACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité

est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (–0–5°C) avant l'usage. Quand il est entreposé à –8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Pr cautions

Destiné à un usage diagnostique in vitro. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et – et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut suivre de bonnes pratiques de laboratoire au cours des opérations de stockage, de distribution et de manipulation de ce matériel¹⁹. **AVERTISSEMENT** L'azide de sodium (NaN₃) peut réagir avec les tuyauteries de plomb et de cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc.

Il faut avoir recours à de bonnes techniques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

Matériel fourni

Immula™ β₂-GP1 IgG ELISA [REF] 1152G

Immula™ β₂-GP1 IgM ELISA [REF] 1152M

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Calibreur A (couverture verte), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Calibreur B (couverture violette), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Calibreur C (couverture bleue), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Calibreur D (couverture jaune), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Régulateur positif (couverture rouge), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulateur négatif (couverture blanche), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.

FR

1 x 12 ml **STOP**

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

2 x **BUF WASH**

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient < 0.1% NaN₃

† **REF** 1152G contient les étalons **B₂-GP1** IgG, les solutions de contrôles et le conjugué IgG


REF 1152M contient les étalons **B₂-GP1** IgM, les solutions de contrôles et le conjugué IgM

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl

- Bouchons de pipette jetables
- Prouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprovettes de test
- Eau distillée ou désionisée
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Nettoyeur automatique de microplaques en mesure de dispenser 200 µl

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou atteints de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à – 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCEDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer le test, lire les présentes instructions avec soin.
- Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes. Remettre le sachet dans le réfrigérateur immédiatement après son utilisation.

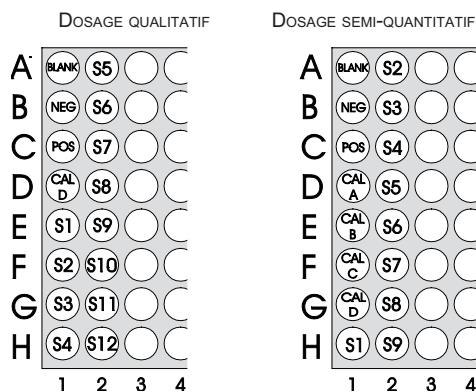
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les bandes inutilisées dans le sachet contenant des produits dessiccatifs et sceller avec soin pour limiter le plus possible l'exposition à la vapeur d'eau.**

tape du lavage : Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**

- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- Un chronométrage soigneux est important. Les périodes d'incubation commencent après avoir dispensé les réactifs.

Procédure de test

1. **TOUS LES REACTIFS DOIVENT ETRE AMENES À TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT USAGE.**
- . Etiqueter le feuillet du protocole pour indiquer l'emplacement du spécimen dans la microplaque. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
3. **Dosage qualitatif** : utiliser seulement le étalon D. **Dosage semi-quantitatif** : Utiliser les étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. **Préparer une dilution 1:101** de spécimen patient en mélangeant 5 μ l de spécimen patient **0.5 ml** de diluant de sérum.
5. Ajouter **100 μ l** d'étalons, de régulateurs positif et négatif et de spécimens patient dilués dans les micropuits appropriés indiqué dans le feuillet du protocole.
Note : Inclure un puits qui contient **100 μ l** du diluant de sérum à titre de réactif blanc. Mettre à zéro le lecteur ELISA sur le réactif blanc. L'absorption de ce puits ne doit pas être supérieure à 0,3.
6. Incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante sur une surface de niveau.
7. tape du lavage : Aspirer soigneusement le contenu de chaque puits. Ajouter \sim 00-300 μ l de la solution de lavage **reconstituée** aux puits et ensuite aspirer. Répéter cette séquence trois fois pour un total de quatre lavages. Renverser la plaque et la tapoter sur un matériau absorbant pour enlever tout le fluide résiduel après le dernier lavage. Ne pas sécher complètement les puits.
8. Ajouter 100 μ l de conjugué à chaque puits.
9. Faire incuber les puits pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.
10. tape du lavage : Recommencer l'étape 7.
11. Ajouter 100 μ l de substrat d'enzyme à chaque puits.
12. Faire incuber les puits pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.

FR

- Ajouter 100 μ L de solution d'arrêt à chaque puits. Maintenir la même séquence et chronométrage pour l'addition de la solution d'arrêt que celle qui fut utilisée pour le substrat d'enzyme. Lire l'absorption (OD) de chacun puits à 405nm dans l'heure qui suit la réaction.
- Lire l'absorption (OD) de chaque puits à 405nm nm en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou a double longueur d'onde (405/630nm) par rapport au réactif blanco programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des étalons, des régulateurs positif et négatif et un réactif blanco doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif blanco doit être inférieure à 0,3. L'étalon doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède à des dosages qualitatifs, la densité optique de l'étalon D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. de l'étalon D}} \times \text{EU/ml de l'étalon D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons patients de la courbe par rapport à la valeur d'absorption correspondante.

Etalon

Les étalons prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patients qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux de l'étalon A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe de l'étalon quand on refait le test. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution. Consulter les courbes standards d'échantillon (Figure 1) à la fin de ce document.

Interprétation

Les informations figurant dans la figure 2 à la fin de ce document servent seulement à titre de guide pour l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

LIMITES DE LA PROCEDURE

Le test ImmuLisa™ Anti - β_2 -GP1 ne devrait pas être exécuté sur des échantillons grossièrement hémolysés, contaminés du point de vue microbien ou lipémiques. Cette méthode doit uniquement être utilisée pour le test d'échantillons de sérum humain.

En outre, un diagnostic ne peut être posé uniquement sur la base des résultats de l'anti - β_2 -GP1. Il faut prendre en ligne de compte les résultats d'autres tests de laboratoire et d'autres constatations cliniques. Quand un test négatif anti- β_2 -GP1 est obtenu en présence d'indications cliniques, un test lupus anticoagulant ou un autre essai supplémentaire est recommandé.

FR

Valeurs attendues

L'incidence de l'anti β_2 -GP1 dans SLE avec thrombose et grossesse est résumée dans le tableau suivant :

Incidence des anticorps ACA et anti β_2 -GP1 dans le SLE¹⁷

	ACA		Anti β_2 -GP1	
	IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
SLE	10	6	12	4
avec thrombose	24	14	27	14
pas de thrombose	8	5	10	3
en grossesse	12	7	15	7
avec mortalité embryonnaire fréquente	20	0	27	0
Pas de mortalité embryonnaire	11	7	14	7

DONNEES DE RENDEMENT

L'utilité des tests Immulisa™ anticorps anti- β_2 -GP1 IgG et IgM ELISA est déterminée par la comparaison des résultats obtenus avec d'autre méthodes ELISA anti- β_2 -GP1 IgG et IgM.

Gamme normale : La gamme normale a été établie en testant 64 échantillons de sérum de donateurs apparemment sains obtenus par la Croix Rouge. La moyenne plus trois écarts types de la moyenne de cette population normale a été utilisée pour déterminer la valeur limite entre individus normaux et individus positifs limites.

Spécificité et sensibilité comparatives :

Les résultats du test pour la comparaison entre les tests anticorps Immulisa™ anti- β_2 -GP1 IgG et IgM et les autres tests disponibles dans le commerce pour les mêmes substances à analyser figurent dans les tableaux 1 et 2 à la fin de ce document.

Réactivité croisée :

Il est bien connu que les patients qui souffrent de maladies infectieuses comme la syphilis possèdent des anticorps du cardiolipide et du lupus anticoagulant. Pour tester la spécificité clinique des essais, nous avons testé le sérum de patients atteints de syphilis pour rechercher la présence d'anti-cardiolipide et anticorps anti β_2 GP1. Les résultats figurent ci-dessous.

	# Testé	# Positif	% Positif
Anti-Cardiolipide (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anti-Cardiolipide (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

Ces études suggèrent que les anticorps β_2 -GP1 sont plus spécifiques que les anticorps anti-cardiolipide dans la mesure où un petit pourcentage seulement de patients atteints de syphilis sont positifs pour les anticorps β_2 -GP1.

Précision :

Deux échantillons avec des concentrations connues d'anti β_2 -GP1 ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Le coefficient de variation intra et inter-essai (CV) apparaît dans les tableaux 3 et 4 à la fin de ce document.

Récupération :

Trois échantillons avec des concentrations connues d'anti- β_2 -GP1 ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon positif contenant des montants connus d'anti- β_2 -GP1. Les niveaux d'anti- β_2 -GP1 des échantillons mélangés ont été déterminés et le pourcentage de récupération calculé sur la base des valeurs obtenues. Les résultats figurent dans les tableaux 5 et 6 à la fin de ce document.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorpi Anti- β_2 GP1 ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1152G Anti- β_2 -GP1 IgG ELISA 96 Determina ioni

REF 1152M Anti- β_2 -GP1 IgM ELISA 96 Determina ioni

Test immunoenzimatico (ELISA) per la ricerca e la semiquantificazione di anticorpi anti- β_2 -GP1 di classe IgG e IgM, come aiuto nella valutazione del rischio di trombosi in individui affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) o patologie simili.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli anticorpi antifosfolipidi sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi contro i fosfolipidi con carica negativa¹. Vengono rilevati primariamente con il test per gli anticorpi anti-cardiolipina (ACA), la falsa-positività dei test biologici per la sifilide e il lupus anticoagulant (LAC). Questi tre test rilevano anticorpi correlati, ma non necessariamente identici, pertanto è spesso necessario eseguire più di uno di questi test per identificare gli anticorpi antifosfolipidi.

Dei vari test per la rilevazione degli anticorpi antifosfolipidi, il test per gli anticorpi anti-cardiolipina, eseguito con il metodo ELISA, è il più sensibile². La presenza degli anticorpi anti-cardiolipina aiuta ad individuare i pazienti a rischio di trombosi venosa e/o arteriosa spesso accompagnate da trombocitopenia, una sindrome conosciuta anche come sindrome antifosfolipidi¹⁻¹². La sindrome antifosfolipidi si riscontra con maggior frequenza in pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) o disturbi analoghi che non rientrano nei criteri per il LES⁵⁻⁷. Livelli elevati di anticorpi anti-cardiolipina si hanno in caso di trombosi, perdita fetale, trombocitopenia e con una serie di altri disturbi¹⁻¹⁵. Livelli bassi di anticorpi anti-cardiolipina si riscontrano in una varietà di patologie cliniche non collegate alla sindrome antifosfolipidi. Osservazioni recenti hanno indicato che affinché gli ACA possano legarsi alla cardiolipina è necessaria la presenza nel siero di un fattore da 50kD. Questo co-fattore è stato successivamente identificato essere la β_2 -GP1 (β_2 -glicoproteina I) o apolipoproteina H¹⁶⁻¹⁸. Malgrado la funzione della β_2 -GP1 non sia ancora chiara, è certo che la sua presenza facilita il legame degli ACA alla cardiolipina. Gli anticorpi anti-cardiolipina, in particolare a bassi livelli, si riscontrano in una varietà di patologie cliniche non correlate alla sindrome antifosfolipidi. Gli ACA presenti nel siero dei pazienti con LES e con altri disturbi autoimmuni sono immunologicamente distinti da quelli nei sieri di pazienti affetti da sifilide. L'uso della proteina β_2 -GP1 come sostituto dell'antigene cardiolipina sulla matrice solida aiuta a generare questa distinzione. Inoltre, gli anticorpi anti- β_2 -GP1 sono molto specifici per la sindrome antifosfolipidi.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test per la ricerca di anticorpi anti- β_2 -GP1 viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida in pozzetti rivestiti con β_2 -GP1. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati da un coniugato anti IgG o IgM umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana della classe appropriata. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (-0—5°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁹. **ATTENZIONE** L'azide sodica (NaN_3) pu reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica pu essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo.

Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

β_2 -GP1 IgG ELISA ImmuLisa™ **REF** 1152G

β_2 -GP1 IgM ELISA ImmuLisa™ **REF** 1152M






I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti- β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti- β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti- β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti- β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per β_2 -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgM umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN_3

REF 1152G contiene calibratori **B₂-GP1 IgG**, controlli e coniugato IgG

REF 1152M contiene calibratori **B₂-GP1 IgM**, controlli e coniugato IgM

Simboli usati sulle etichette: Numero di lotto Numero catalogo Scadenza Temperatura di conservazione Leggere le istruzioni per l'uso Uso diagnostico in vitro Produttore Numero di test**Materiali necessari ma non forniti**

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

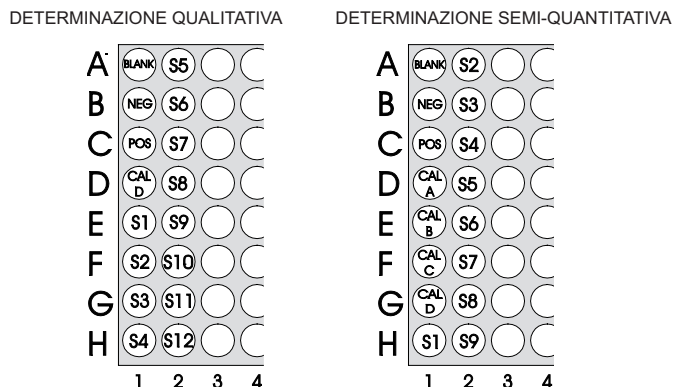
In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA**Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta pi rapida e il tempo di incubazione pi uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.

Metodo del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
- . Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
3. **Determinazione qualitativa:** usare unicamente il Calibratore D.
Determinazione semiquantitativa: usare i Calibratori da A a D pronti all'uso, come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:



4. Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
5. Aggiungere **100 µl** di Calibratori, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.
6. Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
7. Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere ~ 300 µl del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
8. Aggiungere 100 µl di Coniugato in ogni pozzetto.
9. Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
11. Aggiungere 100 µl di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.
12. Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. Aggiungere 100 µl di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
14. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo

negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione. Vedere le curve standard del campione (Figura 1) alla fine di questo foglio illustrativo.

Interpretazione

L'informazione inclusa nella Figura – alla fine di questo foglio serve unicamente da guida per l'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

LIMITAZIONI DEL TEST

Il Test per gli Anticorpi Anti- β_2 -GP1 Immulisa™ non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminati o lipemici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano.

Inoltre, la diagnosi non può essere effettuata unicamente sulla base dei risultati degli anticorpi anti- β_2 -GP1. Dovranno essere considerati i risultati di altri esami di laboratorio e le manifestazioni cliniche. Nel caso di risultati negativi al test anti- β -GP1, in presenza della condizione clinica, è indicata l'esecuzione di un test lupus anticoagulant (LAC) o di una serie di analisi aggiuntive.

Valori Attesi

L'incidenza degli anticorpi anti- β_2 -GP1 nel LES con trombosi e gravidanza è riassunta nella tabella che segue:

Incidenza di anticorpi ACA e Anti- β_2 -GP1 nel LES¹⁷

	ACA		Anti β_2 -GP1	
	IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
LES	10	6	12	4
Con trombosi	24	14	27	14
Trombosi assente	8	5	10	3
In gravidanza	12	7	15	7
Perdita fetale ricorrente	20	0	27	0
Nessuna perdita fetale	11	7	14	7

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

L'utilità del test per gli anticorpi anti- β_2 -GP1 IgG e IgM ELISA ImmuLisa™ è stata determinata comparando i risultati con quelli ottenuti con altri metodi ELISA per gli anticorpi anti- β_2 -GP1 IgG e IgM disponibili in commercio.

Intervallo normale: L'intervallo normale è stato stabilito analizzando 64 campioni di siero da donatori apparentemente sani ottenuti dalla Croce Rossa. Per determinare il valore cut-off di questa popolazione normale è stata utilizzata la media + tre deviazioni standard della media.

Comparabilità, Specificità e Sensibilità:

I risultati ottenuti dalla comparazione tra il test per gli anticorpi anti- β_2 -GP1 IgG e IgM ImmuLisa™ e gli altri test disponibili in commercio per gli stessi analiti sono inclusi nelle Tabelle 1 e 2 alla fine di questo foglio illustrativo.

Reattività incrociata:

noto che i pazienti affetti da malattie infettive come la sifilide presentano anticorpi anti-cardiolipina e lupus anticoagulant, quindi per verificare la specificità clinica dell'analisi, sono stati analizzati per la presenza di anticorpi anti-cardiolipina e anti- β_2 -GP1 sieri ottenuti da pazienti con sifilide. I risultati sono riportati sotto:

	# Analizzato	# Positivo	% Positivo
Anti-Cardiolipina (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anti-Cardiolipina (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

Questi dati riportati suggeriscono che gli anticorpi anti- β_2 -GP1 sono più specifici degli anticorpi anti-cardiolipina in quanto solo una percentuale minima di pazienti con sifilide sono risultati positivi agli anticorpi anti- β_2 -GP1.

Precisione:

Due campioni con concentrazioni note di anticorpi anti- β_2 -GP1 sono state analizzati in 10 replicati nell'arco di un periodo di due settimane. Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio e tra un saggio e l'altro è incluso nelle Tabelle 3 e 4 alla fine di questo foglio illustrativo.

Recupero:

Tre campioni con concentrazioni note di anticorpi anti- β_2 -GP1 sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con livelli noti di anticorpi anti- β_2 -GP1. I valori anti- β_2 -GP1 dei campioni addizionati sono stati successivamente determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono raccolti nelle Tabelle 5 e 6 alla fine di questo foglio illustrativo.



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para Anticorpos Anti- β_2 GP1

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1152G ELISA para Anticorpos IgG β_2 -GP1 96 Determina es

REF 1152M ELISA para Anticorpos IgM β_2 -GP1 96 Determina es

É um imunoensaio enzimático (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos IgG e IgM contra β_2 -GP1, como auxílio na avaliação do risco de trombose em doentes com Lúpus eritematoso sistémico (LES) ou doenças semelhantes a lúpus.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-fosfolípidos são um grupo heterogéneo de auto-anticorpos anti-fosfolípidos carregados negativamente¹. Esses são detectados principalmente pelo teste de anticorpos anti-cardiolipina (ACA), pelo teste biológico falso positivo da sífilis ou pelo teste anticoagulante de lúpus. Estes três testes detectam anticorpos relacionados mas não necessariamente idênticos. Assim, poderá ser necessário um, ou mais, destes testes para identificar os anticorpos antifosfolípidos.

Dos diversos testes de detecção dos anticorpos antifosfolípidos, o teste do anticorpo anti-cardiolipina, efectuado pelo ELISA, é o mais sensível². A presença de anticorpos anticardiolipina ajuda a identificar os doentes em risco de trombose venosa e/ou arterial muitas vezes acompanhada por *trombocitopenia*, uma síndrome referida como *síndrome antifosfolípidos*¹⁻¹². Apresenta-se principalmente em doentes com *Lúpus eritematoso sistémico* (LES) ou doenças semelhantes a lúpus as quais não correspondem aos critérios para LES⁵⁻⁷. Os níveis elevados de anticorpos anti-cardiolipina apresentam-se em trombose, perda fetal, *trombocitopenia* e muitas outras doenças¹⁻¹⁵. Os anticorpos anti-cardiolipina são normalmente detectados pelo ELISA, usando a cardiolipina como antígeno. Observações recentes indicaram que o factor serológico 50 kD é necessário para a ligação de ACA à cardiolipina. Este cofactor foi mais tarde identificado como β_2 -GP1 (β_2 -glicoproteína I) ou também como apolipoproteína H¹⁶⁻¹⁸. Apesar de a função de β_2 -GP1 não ser ainda clara, a verdade é que a presença de β_2 -GP1 facilita a ligação de ACA à cardiolipina. Os anticorpos anti-cardiolipina, especialmente a níveis reduzidos, encontram-se numa variedade de doenças clínicas não relacionadas com a síndrome antifosfolípidos. Os ACA presentes no soro de doentes com LES e outras doenças auto-imunes são imunologicamente distintos do soro de doentes com sífilis. O uso da proteína β_2 -GP1 como substituto do antígeno cardiolipina na matriz sólida ajuda a efectuar esta distinção. Para além disso, os anticorpos anti- β_2 -GP1 são muito específicos da síndrome antifosfolípidos.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como imunoensaio de fase sólida (ELISA) em micropoços revestidos de β_2 -GP1. Os Controlos, calibradores e amostras de soro do doente são incubados nos poços revestidos com antígeno o que permite a ligação dos anticorpos presentes no soro. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram aos micropoços são detectados juntando aos micropoços um conjugado de IgG ou IgM anti-humana marcado com enzima. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe apropriada. O conjugado enzimático que não se ligou é eliminado por lavagem. Depois junta-se aos micropoços um substrato enzimático específico (pNPP) e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração de cor provocada pela conversão do substrato pNPP.

A reacção é interrompida e a intensidade da cor altera-se, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades enzima por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserva todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize o reagente se não estiver limpo ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da

utiliza o. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tempo de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tempo de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de microporos revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais¹⁹. ATENÇÃO - a azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as tubagens de cobre ou chumbo para formar azidas metálicas muito explosivas. Na eliminação de líquidos, juntar quantidades abundantes de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director do laboratório ou o Centro de Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc.

Respeite as técnicas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana e química. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos IgG β₂-GP1 ImmuLisa™ **REF** 1152G

ELISA para Anticorpos IgM β₂-GP1 ImmuLisa™ **REF** 1152M

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE B2GP1	Microplaca com microporos individuais destacáveis revestidos com antígeno β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A B2GP1 *†	Calibrador A pronto a usar (tampa verde). Soro humano contendo anticorpos para β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B B2GP1 *†	Calibrador B pronto a usar (tampa violeta). Soro humano contendo anticorpos para β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C B2GP1 *†	Calibrador C pronto a usar (tampa azul). Soro humano contendo anticorpos para β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D B2GP1 *†	Calibrador D pronto a usar (tampa amarela). Soro humano contendo anticorpos para β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + B2GP1 *†	Controlo positivo pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para β ₂ -GP1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (tampa branca). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 12 ml	IgM-CONJ ALKPHOS *†	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.

PT

1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃


† **REF** 1152G contém calibradores IgG **B₂-GP1**, controlos e conjugado IgG

REF 1152M contém calibradores IgM **B₂-GP1**, controlos e conjugado IgM

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT N.º mero de lote

REF N.º mero de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico in vitro

 Fabricante

 N.º mero de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

Pipetas para 5 a 1000 µl

- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de comprimento de onda dual, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente

Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 100 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente estas instruções antes de iniciar o teste.
- Deixe que todos os reagentes e amostras se estabilizem à temperatura ambiente (20-26 °C) por 30 minutos. Guarde os produtos imediatamente no frigorífico depois do uso.

PT

- Prepare todas as diluições das amostras do doente antes de iniciar o teste.
- **Guarde imediatamente as tiras não usadas no pacote com dessecantes e fechar bem para reduzir a exposição a vapor de água.**
- Passo de lavagem: É imprescindível uma boa técnica. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Os tempos são muito importantes. Os períodos de incubação iniciam após a distribuição dos reagentes.

Método de teste

1. **OS REAGENTES DEVEM ESTAR TODOS À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 °C) ANTES DE INICIAR O TESTE.**
2. Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nas microplacas. É uma boa prática de laboratório testar as amostras em duplicado.
3. **Determinação qualitativa:** use apenas o Calibrador D. **Determinação semiquantitativa:** use os Calibradores A - D como ilustrado no exemplo abaixo.

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

4. Prepare uma diluição da amostra do doente a **1:101** misturando **5 l** da amostra do doente com **0,5 ml** de Diluente de Soro.
5. Adicione **100 l** de Calibradores, Controlos Positivo e Negativo e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços indicados na folha de protocolo
Nota: Inclua um poço com **100 l** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância deste poço não deve ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** (± 5 minutos) à temperatura ambiente numa superfície plana.
7. Passo de lavagem: Aspire muito bem o conteúdo de cada poço. Junte '00-300 l do tampão de lavagem **reconstituído** a todos os poços e depois aspire. Repita esta sequência mais três vezes por um total de quatro lavagens. Vire a placa ao contrário e bata em material absorvente para eliminar todos os resíduos fluidos após a última lavagem. Não enxugue completamente os poços.
8. Junte 100 l de Conjugado a cada poço.
9. Incube os poços por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
10. Passo de lavagem: Repita o passo 7.
11. Adicione 100 l de Substrato enzimático a cada poço.
12. Incube os poços por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.

PT

13. Junte 100 μ l de Solu \tilde{c} o de Paragem a cada po \tilde{c} o. Mantenha a mesma sequ \tilde{e} ncia e tempos da Solu \tilde{c} o de Paragem como efectuado para o Substrato Enzim \acute{a} tico. Leia a absorv \acute{a} ncia (DO) de cada po \tilde{c} o a 405 nm no prazo de uma hora da interrup \tilde{c} o da reac \tilde{c} o.
14. Leia a absorv \acute{a} ncia (DO) de cada po \tilde{c} o a 405 nm usando um leitor de comprimento de onda simples ou duplo (405/630 nm) em rela \tilde{c} o ao branco de reagente definido em absorv \acute{a} ncia zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precis \acute{a} o do teste. A leitura da absorv \acute{a} ncia do

branco de reagente deve ser $< 0,3$. O Calibrador A dever \acute{a} ter uma leitura de absorv \acute{a} ncia n \acute{a} o inferior a 1,0, caso contr \acute{a} rio o teste dever \acute{a} ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml dever \acute{a} ser calculada a m \acute{e} dia das duas leituras. Quando se efectuam determina \tilde{c} es qualitativas, a densidade \acute{o} ptica do Calibrador D deve ser superior \grave{a} do Controlo Negativo e inferior \grave{a} absorv \acute{a} ncia do Controlo Positivo. Para determina \tilde{c} es semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

RESULTADOS

C \acute{a} lculos

As concentra \tilde{c} es das amostras do doente podem ser determinadas em dois m \acute{e} todos:

1. DETERMINA \tilde{C} O QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml de Calibrador D = UE/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINA \tilde{C} O SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorv \acute{a} ncia dos Calibradores A a D em rela \tilde{c} o \grave{a} respectiva concentra \tilde{c} o num papel milim \acute{e} trico linear. Registe a concentra \tilde{c} o em UE/ml na coordenada X em rela \tilde{c} o \grave{a} absorv \acute{a} ncia na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentra \tilde{c} es das amostras do doente a partir da curva em rela \tilde{c} o ao correspondente valor de absorv \acute{a} ncia.

Calibrador

Os calibradores s \acute{a} o inclu \acute{i} dos para assegurar uma semiquantifica \tilde{c} o e devem ser usados em todos os testes. As amostras de doente que cont \acute{e} m n \acute{i} veis altos de anticorpos podem dar valores de absorv \acute{a} ncia superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precis \acute{a} o, essas amostras devem ser mais dilu \acute{i} das de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando s \acute{a} o novamente testadas. Para a determina \tilde{c} o de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de dilu \acute{i} o. Veja as curvas padr \acute{o} das amostras (Figura 1) no fim deste documento.

Interpreta \tilde{c} o

As informa \tilde{c} es da Figura 2 no fim deste documento serve apenas como guia para a interpreta \tilde{c} o dos resultados de laborat \acute{o} rio. Cada laborat \acute{o} rio deve determinar os seus pr \acute{o} prios valores normais.

LIMITA \tilde{C} OES DO PROCEDIMENTO

O teste para Anticorpos Anti- β_2 -GP1 ImmuLisa $^{\text{TM}}$ n \acute{a} o deve ser efectuado em amostras muito hemolisadas, contaminadas com micr \acute{o} bios ou lip \acute{e} micas. Este m \acute{e} todo s \acute{o} deve ser utilizado para testar amostras de soro humano.

Para al \acute{e} m disso, n \acute{a} o se deve efectuar um diagn \acute{o} stico apenas em base aos resultados anti- β_2 -GP1. Devem ser considerados outros testes de laborat \acute{o} rio e descobertas cl \acute{i} nicas. Quando se regista um teste anti- β_2 -GP1 negativo na presen \tilde{c} a de indica \tilde{c} es cl \acute{i} nicas, recomenda-se um teste anticoagulante de l \acute{u} pus ou outros testes adicionais.

PT

Valores previstos

A incidência de anticorpos anti- β_2 -GP1 em LES na presença de trombose e gravidez está resumida na seguinte tabela:

	ACA		Anti β_2 -GP1	
	IgG	IgM	IgG	IgM
	%	%	%	%
LES	10	6	12	4
com trombose	24	14	27	14
sem trombose	8	5	10	3
em gravidez	12	7	15	7
com perda fetal repetitiva	20	0	27	0
sem perda fetal	11	7	14	7

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade dos testes de ELISA Anticorpos anti- β_2 -GP1 IgG e IgM Immulisa™ foi determinada pela comparação dos resultados com outros métodos ELISA para anticorpos anti- β_2 -GP1 IgG e IgM adquiridos no comércio.

Intervalo normal: O intervalo normal foi estabelecido testando 64 amostras de soro de doadores aparentemente saudáveis obtidos pela Cruz Vermelha. Os desvios padrão da média, mais três, da média desta população normal, foram usados para determinar a diferença entre indivíduos normal e positivos no limite.

Especificidade e sensibilidade comparativas

Os resultados dos testes de comparação entre os testes para Anticorpos Anti- β_2 -GP1 IgG e IgM Immulisa™ e outros testes adquiridos no comércio para o mesmo analisado estão indicados nas Tabelas 1 e 2 no fim deste documento.

Reactividade cruzada:

Sabe-se que os doentes que sofrem de doenças infecciosas tais como a sífilis têm anticorpos e cardiolipina e anticoagulantes lupus. Para testar a especificidade clínica dos testes, testámos soros de doentes com sífilis para verificar a presença de anticardiolipina e anticorpos anti- β_2 -GP1. Os resultados estão descritos abaixo.

	N.º Testados	N.º Positivos	% Positivos
Anticardiolipina (ACA) IgG	49	49	100
Anti- β_2 -GP1 IgG	49	2	4
Anticardiolipina (ACA) IgM	50	17	34
Anti- β_2 -GP1 IgM	50	4	8

Estes estudos sugerem que os anticorpos anti- β_2 -GP1 são mais específicos que os anticorpos anti-cardiolipina visto que apenas uma pequena percentagem de doentes com sífilis são positivos a anticorpos anti- β_2 -GP1.

Precisão:

Foram testadas duas amostras com concentrações conhecidas de anticorpos anti- β_2 -GP1 em 10 cópias ao longo de um período de duas semanas. O coeficiente de variação (CV) intra- e inter-teste está ilustrado nas tabelas 3 e 4 no fim deste documento.

Recuperação:

Três amostras com concentrações conhecidas de anticorpos anti- β_2 -GP1 foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com níveis conhecidos de anticorpos anti- β_2 -GP1. Os valores de anticorpos anti- β_2 -GP1 das amostras misturadas foram então determinados e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados encontram-se na tabelas 5 e 6 no fim deste documento.

REFERENCES I ΛΙΟΓΡΑΦΙΑ LITERATUR BIBLIOGRAPHIE BIBLIOGRAFIA

1. Harris EN, Phil M, Asherson RA et al. Antiphospholipid antibodies - antibodies with a difference. *Ann Rev Med*; 1988, 39:261-271.
2. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD and Hughes GRV. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis*; 1988, 157:23-31.
3. Lockshin MD. Anti-cardiolipin antibody. *Arth Rheum*; 1987, 30:471-472.
4. Derksen RHW, Beisma D, Bouma BN et al. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin antibodies and the lupus anti-coagulant. *Arth Rheum*; 1986, 29:1295-1296.
5. Alarconegovia D, Deleze M, Oria CV et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Medicine*; 1989, 68:353-365.
6. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*; 1989, 20:52-67.
7. Montecucco C, Longhi M, Caporali R et al. Hematological abnormalities associated with anticardiolipin antibodies. *Hematologica*; 1989, 74:195-204.
8. Asherson RA, Khamashta MA, ORDI-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine*; 1989, 68:366-374.
9. Walport MJ. Pregnancy and antibodies to phospholipids. *Ann Rheum Dis*; 1989, 48:795-797.
10. Machworth-Young CG, Loizou S and Walport MJ. Antiphospholipid antibodies and disease. *Medicine*; 1989, 72:767-777.
11. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheumatol*; 1985, 1:591-609.
12. Lubbe WF, Palmer SJ, Butler WS and Laggins GC. Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus anticoagulant. *Lancet*; 1983, 1:1361-1363.
13. Hogan MJ, Brunet DG, Ford PM et al. Lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies and migraine. *Can J Neurological Sci*; 1988, 15:420-425.
14. Harris EN, Pierangeli S. Antiphospholipid antibodies: method of detection. *Am J Reproduct Immunol*; 1992, 28:208-210.
15. Silveira LH, Lopez LR, Uzzle RT et al. IgA, IgG and IgM anticardiolipin antibodies in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum 56th Annual Meeting*; 1992, S125.
16. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN and Krilis SA. 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*. 87:4120-4124, 1990.
17. Matsuura E, Igarashi Y, Jugimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin cofactor. *J Immunol*. 148:3885-3891, 1992.
18. Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Yasuda T and Koike T. Molecular definition of human β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of β_2 -GPI in alternation of anticardiolipin binding. *Int Immunol*. 3:1217-1221, 1991.
19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health; 1993, (HHS Pub. No [CDC] 93-8395).

Figure 1. Standard Curve

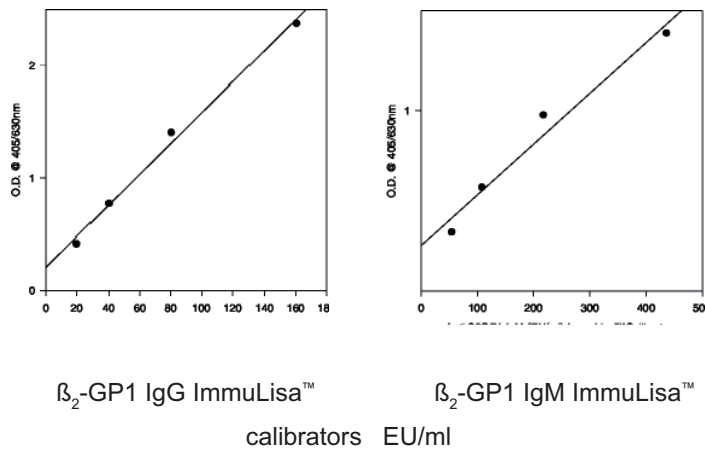


Figure 2. Interpretation

Anti- β_2 -GP1 IgG/IgM	
Value	Interpretation
<20 EU/ml	Neg (-)
20 - 25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Pos (+)

Table 1. ImmcoB Anti- β_2 -GP1 IgG vs. Other ELISA

		ImmcoB AGA-IgA		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other ELISA	POS (+)	17	0	17
	NEG (-)	1	74	75
	TOT (=)	18	74	92

relative specificity: 99%
 relative sensitivity: 100%
 relative agreement: 99%

Table 2. ImmcoB Anti- β_2 -GP1 IgM vs. Other ELISA

		ImmcoB AGA-IgG		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Other ELISA	POS (+)	16	2	18
	NEG (-)	1	49	50
	TOT (=)	17	51	68

relative specificity: 96%
 relative sensitivity: 89%
 relative agreement: 98%

Table 3. Anti- β_2 -GP1 IgG Precision

β_2 -GP1 IgG	Intra-plate	Inter-plate
	CV	CV
1.	7.8%	6.2%
2.	9.7%	7.0%

Table 4. Anti- β_2 -GP1 IgM Precision

β_2 -GP1 IgM	Intra-plate	Inter-plate
	CV	CV
1.	8.1%	11.4%
2.	9.6%	11.7%

Table 5. Anti- β_2 -GP 1 IgG Recovery

IgG	EU/ml added	EU/ml obtained	% Recovery
1.	109.5	114.8	105%
2.	55	59	107%
3.	45.5	45.1	99%

Table 6. Anti- β_2 -GP 1 IgM Recovery

IgM	EU/ml added	EU/ml obtained	% Recovery
1.	169.5	168.7	100%
2.	84.5	87.2	103%
3.	70.5	75.7	107%



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU A thori ed Representati e/A torisierter Repr sentant/Rappresentante

A torri ato/Representante A tori ado/Repr sentant A toris

EMERGO Gro p, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com