



DCM114-7
Ed. 09/2018

Anti Phospholipid Screen

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli autoanticorpi anti fosfolipidi in siero o plasma umano

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C - 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO114

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti Phospholipid Screen è un test immunoenzimatico indiretto in fase solida per la misurazione quantitativa degli auto-anticorpi di classe IgG e IgM diretti contro fosfolipidi anionici del siero mediati dalla 2-glicoproteina (Cardiolipina, Fosfatidil serina, Fosfatidil inositolo, Acido fosfatidico, Fosfatidil colina, Lisofosfatidil colina e Fosfatidil etanol-ammina) su siero o plasma umano. Il test si intende per uso diagnostico in vitro come supporto nella diagnosi di aumentato rischio di trombosi in pazienti con Lupus Eritematosus Sistemico (LES) o disordini simili. Il kit Anti Phospholipid Screen è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il primo studio sugli anticorpi anti-fosfolipidi iniziò nel 1906 quando Wasserman introdusse un test sierologico per la sifilide. Nel 1942 fu scoperto che la componente attiva era un fosfolipide indicato con il nome di Cardiolipina. Negli anni '50 emerse che un elevato numero di persone risultava essere positivo al test per la sifilide senza però presentare alcuna evidenza della malattia. All' inizio si etichettò il fenomeno come una serie di falsi positivi al test per la sifilide, in seguito emerse che in questo gruppo di pazienti vi era una elevata prevalenza di disordini autoimmuni tra cui il Lupus Eritematosus Sistemico (LES) e la Sindrome di Sjögrens.

Il termine Lupus anticoagulante (LA), utilizzato per la prima volta nel 1972, deriva da osservazioni sperimentali nelle quali si osservò un aumento del rischio di trombosi paradossalmente alla presenza di alcuni fattori anticoagulanti; il termine LA non è del tutto corretto poiché la patologia si presenta più frequentemente in pazienti senza lupus ed è associato a trombosi piuttosto che a sanguinamento anormale.

Negli anni più recenti è stato investigato il ruolo di un cofattore, la proteina 2-glicoproteina I (apolipoproteina H) detto anche 2GPI, e le sue interazioni con i fosfolipidi anionici contenuti nel siero/plasma umano. Questo cofattore è una γ -globulina con peso molecolare 50 kDa che si trova nel plasma alla concentrazione di circa 200 μ g/mL. Si è scoperto che 2GPI è coinvolto nella regolazione della coagulazione del sangue, inibendo la via intrinseca. 2GPI in vivo è associato con sostanze cariche negativamente, quali ad esempio fosfolipidi anionici, eparina e lipoproteine. La regione che lega i fosfolipidi è situata nel suo quinto dominio.

Con l'acronimo "aPL" (anticorpi anti-fosfolipidi) si intendono impropriamente anticorpi diretti contro fosfolipidi carichi negativamente quali la Cardiolipina (CL), Fosfatidil serina (PS) Fosfatidil inositolo (PI) e Acido fosfatidico (PA); secondo una accezione più corretta del termine, vanno intesi come anticorpi anti-fosfolipidi quegli anticorpi diretti contro il complesso tra 2GPI e i fosfolipidi anionici in

grado di legarsi al dominio quinto della 2GPI. Tra questi, la Cardiolipina è il fosfolipide usato più comunemente come antigene per dosare gli aPL con metodo ELISA. Anticorpi diretti contro il complesso tra 2GPI e fosfolipidi carichi negativamente, quali Fosfatidil serina (PS) Fosfatidil inositolo (PI) e Acido fosfatidico (PA) vengono misurati nel laboratorio diagnostico.

Alcuni ricercatori hanno suggerito che l'utilizzo della PS al posto della Cardiolipina nei dosaggi ELISA permetterebbe una diagnosi più precisa. Tuttavia, questi anticorpi anti fosfolipidi sono usati meno comunemente e il loro utilizzo aggiuntivo può aumentare la sensibilità clinica nei campioni di pazienti con sospetta Sindrome Anti-fosfolipidica (APS), ma non possono sostituire la determinazione degli autoanticorpi anti Cardiolipina.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il dosaggio Anti Phospholipid Screen si basa sul legame degli anticorpi presenti nel siero e diretti contro i complessi antigenici formati da fosfolipidi anionici (Cardiolipina, Fosfatidil serina, Fosfatidil inositolo, Acido fosfatidico, Fosfatidil colina, Lisofosfatidil colina e Fosfatidil etanol-ammina) e la 2-Glicoproteina; questi complessi sono adsorbiti sulla micropiastra. Gli anticorpi di tipo IgG e IgM diretti verso questi antigeni e presenti nei calibratori, nei controlli, e nei campioni di siero o plasma prediluiti dei pazienti, si legano quindi ai rispettivi antigeni.

Dopo 60 minuti di incubazione la micropiastra viene lavata con Wash Solution per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito.

Una soluzione di immunoglobuline anti-human IgG (Conjugate IgG, reattivo 4) o anti-human IgM (Conjugate IgM, reattivo 5) riconosce gli anticorpi di classe IgG o IgM (rispettivamente) legati agli antigeni immobilizzati.

Dopo 30 minuti di incubazione, l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente, viene rimosso tramite lavaggio con apposito tampone (Wash Solution).

Si aggiunge poi una soluzione substrato cromogenica (TMB Substrate) contenente Tetrametilbenzidina. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della Stop Solution. Il colore della soluzione diventa giallo, e l'intensità di colore sviluppata è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG o IgM presenti nel campione originale.

La concentrazione di anticorpi IgG o IgM presenti nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1,2 mL ciascuno)

Tampone fosfato 0,1M, NaN₃ < 0,1%, siero umano

CAL0 **REF DCE002/11406-0**

CAL1 **REF DCE002/11407-0**

CAL2 **REF DCE002/11408-0**

CAL3 **REF DCE002/11409-0**

CAL4 **REF DCE002/11410-0**

2. Controlli (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)

Tampone fosfato 0,1M, NaN₃ < 0,1%, siero umano

Positive Control **REF DCE045/11402-0**

Negative Control **REF DCE045/11401-0**

3. Sample Diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1M, NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugate IgG (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%

REF DCE002/11402-G

5. Conjugate IgM (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgM coniugate con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%

REF DCE002/11402-M

6. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Complessi antigenici di fosfolipidi e 2-Glicoproteina adsorbiti su micropiastra

REF DCE002/11403-0

7. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*

REF DCE004-0

8. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M *(evitare il contatto con la pelle)*

REF DCE005-0

9. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 6 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di

altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PREACUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso**.
A tale scopo Dia.Metra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.

- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

I Calibratori sono pronti all'uso e sono misti, pertanto contengono sia gli anticorpi IgG che IgM. I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

Una volta aperti sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Per l'esecuzione del test si possono utilizzare campioni di siero o di plasma umano. I campioni da utilizzare devono essere limpidi. Si consiglia di evitare contaminazioni dovute a iperlipemia, anche se queste non interferiscono con l'analisi. I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C fino a 5 giorni, oppure conservati a -20°C fino a 6 mesi. Si consiglia di evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni di siero che potrebbero determinare una perdita variabile dell'attività degli autoanticorpi. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

Tutti i campioni di siero e plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent; per esempio 10 µL di siero vengono diluiti con 990 µL di sample diluent.

I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni flacone di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli, per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.

- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campione /Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate (IgG or IgM)	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO DI QUALITA'

- Il Controllo Positivo per anti-fosfolipidi deve essere incluso ogni volta che si esegue il test per assicurare che tutti i reagenti ed il test funzionino in modo corretto.
- Poiché il Controllo è prediluito, esso non rappresenta un controllo procedurale per le tecniche di diluizione utilizzate per i campioni.
- Ulteriori sieri di controllo possono essere preparati raccogliendo un pool di sieri umani, aliquidandolo e conservandolo a < -20°C.
- Perchè i risultati del test siano considerati validi, tutti i seguenti criteri devono essere soddisfatti. Se anche uno solo non rientra nei valori specificati, i risultati non dovrebbero essere considerati validi ed il test dovrebbe essere ripetuto:

- Il Controllo Positivo serve per controllare un'eventuale malfunzionamento dei reagenti e non assicura la precisione in corrispondenza del valore soglia del test.

- Il test è valido solo se la densità ottica a 450 nm del Controllo Positivo come pure quelle dei calibratori (C₀-C₄) coincidono con gli intervalli corrispondenti indicati nel Certificato di Controllo di Qualità incluso nel kit.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Per il kit Anti Phospholipid Screen il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva lin-log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti Phospholipid Screen:

	IgG (GPL AU/mL)	IgM (MPL AU/mL)
Normale	< 10	< 10
Elevato	10	10

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di anticorpi anti fosfolipidi serici.

10. LIMITAZIONI DEL TEST

La presenza nel campione di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline può determinare delle reazioni aspecifiche con conseguenti risultati falsi positivi.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione e riproducibilità

La precisione e la riproducibilità sono state valutate testando due campioni in due esperimenti diversi con due lotti di kit differenti.

Le operazioni di dispensazione e lavaggio sono state eseguite da un operatore manualmente.

I risultati in termini di deviazione standard e coefficienti di variazione sono riportati di seguito:

Campione	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	1.03	5.9	1.31	7.4
Inter-assay	0.26	9.2	5.25	11.7
Campione	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	0.61	7.6	1.97	5.9
Inter-assay	0.15	7.1	2.98	6.6

11.2. Sensibilità:

La sensibilità clinica del saggio Anti Phospholipid Screen IgG è 92,3%.

La sensibilità clinica del saggio Anti Phospholipid Screen IgM è 68,8%.

11.3. Specificità:

La specificità clinica del saggio Anti Phospholipid Screen IgG è 84,6%.

La specificità clinica del saggio Anti Phospholipid Screen IgM è > 99,9%.

11.4. Limite di rilevabilità:

La minor concentrazione che può essere distinta dal Calibratore zero è di circa 0,03 AU/mL per IgG e 0,16 AU/mL per IgM.

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumat. 13, 3: 486-489, 1986.
- Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. Clin. Exp. Immunol. 68: 215-222, 1987.
- Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. Zeitschrift für Klinische Medizin 16: 1399-1401, 1988.
- Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. Blood, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.

Ed. 09/2018

DCM114-7



DCM114-7
Ed. 09/2018

Anti Phospholipid Screen

for routine analysis

Quantitative determination of auto-antibodies against phospholipids in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO114

INTENDED USE

Anti Phospholipid Screen is an indirect solid phase immunoassay kit for the quantitative measurement of IgG and IgM class auto-antibodies directed against 2-glycoprotein mediated anionic phospholipids in human serum or plasma, including Cardiolipin, Phosphatidyl serine, Phosphatidyl inositol, Phosphatidic acid, Phosphatidyl choline, Lyso-phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of increased risk of thrombosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) or similar disorders.

Anti Phospholipid Screen kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The first study on the anti-phospholipid antibodies began in 1906 when Wasserman introduced a serological test for syphilis. In 1942 it was found the active component that is a phospholipid indicated by the name of Cardiolipin. In the 50's it was observed that a large number of people appeared to be positive for syphilis tests but did not show any evidence of disease. At the beginning the phenomenon was classified as a series of false positive syphilis test, then a more accurate analysis revealed, for this group of patients, a high prevalence of autoimmune disorders including Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sjögrens syndrome.

The term lupus anticoagulant (LA), used for the first time in 1972, derives from experimental observations in which it was observed an increased risk of thrombosis, paradoxically, with the presence of some anticoagulants factors; the term LA is not totally correct, in fact the disease is present more frequently in patients without lupus and it is associated with thrombosis rather than to abnormal bleeding.

Some years later the role of a cofactor has been investigated, the 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) also said 2GPI, and its interactions with anionic phospholipids in human serum / plasma. This cofactor is a β -globulin with a molecular weight of 50 kDa that has the concentration of 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in plasma. The 2GPI is involved in the regulation of blood coagulation, inhibiting the intrinsic way.

2GPI in vivo is associated with negatively charged substances such as anionic phospholipids, heparin and lipoproteins. The region that binds phospholipids is in its fifth domain.

The acronym "aPL" (anti-phospholipid antibodies) indicates improperly antibodies directed against phospholipids negatively charged like Cardiolipin (CL), Phosphatidyl serine (PS) Phosphatidyl inositol (PI) and phosphatidic acid (PA); more correctly the term anti-phospholipid antibodies indicate those antibodies directed against the complex

between 2GPI and anionic phospholipids that can bind to the fifth domain of 2GPI. Among these, the Cardiolipin is the most commonly used phospholipid as an antigen for determining the aPL with ELISA method. Diagnostic laboratories measure the antibodies directed against the complex between 2GPI and negatively charged phospholipids, as Phosphatidyl serine (PS) Phosphatidyl inositol (PI) and phosphatidic acid (PA). Some researchers suggest the use of PS instead of Cardiolipin in ELISA assays, for a more precise diagnosis. However, these antibodies against phospholipids are less commonly used, even if their use may increase the clinical sensitivity of patients samples with suspected Anti-phospholipid Syndrome (APS), but it can't replace the determination of autoantibodies anti-Cardiolipin.

2. PRINCIPLE

Anti Phospholipid Screen test is based on the binding of antibodies in human serum directed against the antigenic complex between anionic phospholipids (Cardiolipin, Phosphatidyl serine, Phosphatidyl inositol, Phosphatidic acid, Phosphatidyl choline, Lyso-phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine) and 2-Glycoprotein; these complexes are coated on the microplate. Any antibody of IgG class or IgM class in calibrators, controls or prediluted patient samples binds to its respective antigen.

After 60 minutes incubation, the microplate is washed with wash buffer for removing non-reactive serum components. An anti-human IgG conjugate solution (Conjugate IgG, reactive 4) or an anti-human IgM conjugate solution (Conjugate IgM, reactive 5) recognize IgG class or IgM class antibodies, respectively, bound to the immobilized antigens.

After a 30 minutes incubation any excess enzyme conjugate which is not specifically bound is washed away with the wash buffer.

A chromogenic substrate solution containing TMB is then dispensed into the wells. After a 15 minutes incubation the color development is stopped by adding the stop solution. The solutions color change into yellow. The amount of color is directly proportional to the concentration of IgG or IgM antibodies present in the original sample.

The concentration of IgG or IgM antibodies in the original sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators** (5 vials, 1,2 mL each)
Phosphate buffer 0,1M, NaN₃ < 0,1%, human serum
CAL0 **REF DCE002/11406-0**
CAL1 **REF DCE002/11407-0**
CAL2 **REF DCE002/11408-0**
CAL3 **REF DCE002/11409-0**
CAL4 **REF DCE002/11410-0**
- Controls** (2 vials, 1,2 mL each, ready to use)
Phosphate buffer 0,1M, NaN₃ < 0,1%, human serum
Positive Control **REF DCE045/11402-0**
Negative Control **REF DCE045/11401-0**
- Sample Diluent** (1 vial, 100 mL)
Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%
REF DCE053-0
- Conjugate IgG** (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgG conjugate with horseradish peroxidase (HRP),
BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/11402-G**
- Conjugate IgM** (1 vial, 15 mL)
Anti h-IgM conjugate with horseradish peroxidase (HRP),
BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/11402-M**
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Antigenic phospholipid and 2-Glicoprotein complexes
coated on the microplate **REF DCE002/11403-0**
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*avoid any skin contact*)
REF DCE004-0
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0,15M (*avoid any skin contact*)
REF DCE005-0
- 10X Conc. Wash Solution** (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm).

Notes

Store all reagents between 2--8°C in the dark.
Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same

manner as potentially infectious material.

- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Dia.Metra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop

Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators (C₀...C₄)

The Calibrators are ready to use and are mixed, so they have both IgG and IgM antibodies. The Calibrators have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Sample Preparation

Either human serum or plasma samples can be used for the test execution. Test samples should be clear. Contamination by lipemia should be avoided, although it does not interfere with this assay. Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months. Avoid repetitive freezing and thawing of serum samples. This may result in variable loss of autoantibody activity. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

All serum and plasma samples have to be diluted 1:100 with sample diluent; for example 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The Controls are ready to use.

6.3. Wash Solution Preparation

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals. In this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals is observed. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer the crystals completely, then mix until the crystals are completely dissolved.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagents	Calibrator	Sample/Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate (IgG or IgM)	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

- The anti-phospholipids Positive Control should be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures perform properly.
- Because Positive Control is prediluted, it does not control for procedural methods associated with dilution of specimens.
- Additional suitable control sera may be prepared by aliquoting pooled human serum specimens and storing at < -20°C.
- In order for the test results to be considered valid, all of the criteria listed below must be met. If any of these are not met, the test should be considered invalid and the assay repeated:
 - The Positive Control are intended to monitor for substantial reagent failure and they will not ensure precision at the assay cut-off.
 - This test is only valid if the optical density at 450 nm for Positive Control as well as for the Calibrator (C₀-C₄) complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit.

8. RESULTS

For Anti Phospholipid Screen kit a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However we recommend using a Lin-Log Plot. First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may

also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

9. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti Phospholipid Screen test:

	IgG (GPL AU/mL)	IgM (MPL AU/mL)
Normal	< 10	< 10
Elevated	10	10

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of seric Ab-Anti-Phospholipid.

10. LIMITATIONS OF PROCEDURE

The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision and reproducibility

Precision and reproducibility are evaluated by eight reply of two positive samples by two different runs with two different lots. Dispensing and washing operations were performed manually by an operator.

The results in terms of standard deviation and coefficient of variation were below:

Sample	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	1.03	5.9	1.31	7.4
Inter-assay	0.26	9.2	5.25	11.7
Sample	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	0.61	7.6	1.97	5.9
Inter-assay	0.15	7.1	2.98	6.6

11.2. Sensitivity

The clinical sensitivity of Anti Phospholipids Screen IgG assay is 92,3%.

The clinical sensitivity of Anti Phospholipids Screen IgM assay is 68,8%.

11.3. Specificity

The clinical specificity of Anti Phospholipids Screen IgG assay is 84,6%.

The clinical specificity of Anti Phospholipids Screen IgM assay is > 99,9%.

11.4. Detection Limit

The lowest concentration that can be distinguished from Calibrator zero is 0.03 AU/mL for IgG and 0.16 AU/mL for IgM.

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations..

BIBLIOGRAPHY

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumat. 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. Clin. Exp. Immunol. 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. Zeitschrift für Klinische Medizin 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. Blood, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.

Ed. 09/2018

DCM114-7



DCM114-7
Ed. 09/2018

Anti Phospholipid Screen

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa de autoanticuerpos anti-fosfolípidos en suero o plasma

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C  8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO114

USO PREVISTO

El kit de análisis anti-fosfolípidos es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la determinación cuantitativa en suero o plasma humano de autoanticuerpos de tipo IgG e IgM contra los fosfolípidos aniónicos mediados por la β_2 glicoproteína, incluyendo cardiolipina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, fosfatidil colina, lisofosfatidil colina y fosfatidil etanolamina. El ensayo está diseñado para uso diagnóstico *in vitro*, como coadyuvante en el diagnóstico de mayor riesgo de trombosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o trastornos similares.

El kit Anti Phospholipid Screen está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El primer estudio sobre anticuerpos anti-fosfolípidos data de 1906, cuando Wasserman introdujo un análisis serológico para la sífilis. En 1942 se descubrió que el componente activo era un fosfolípido indicado con el nombre de cardiolipina. En los años 50 se observó que un gran número de personas era positiva al análisis de la sífilis aunque no presentaba ninguno de los síntomas de la enfermedad. Al principio, el fenómeno fue catalogado como una serie de resultados falsamente positivos al análisis de sífilis; más tarde se advirtió que en este grupo de pacientes había una gran preponderancia de trastornos autoinmunes, entre ellos el lupus eritematoso sistémico (LES) y el síndrome de Sjögrens.

El término *lupus anticoagulante* (LA), utilizado por primera vez en 1972, deriva de observaciones experimentales en las que se advirtió un aumento del riesgo de trombosis, paradójicamente en presencia de algunos factores anticoagulantes; el término LA no es del todo incorrecto, porque la patología es más frecuente en pacientes sin lupus y va asociada a trombosis antes que a sangrado anormal.

En años más recientes, se investigó el papel de un cofactor, la proteína β_2 -glicoproteína I (apolipoproteína H) también llamada β_2 GPI, y su interacción con los fosfolípidos aniónicos contenidos en el suero o plasma humanos. Este cofactor es una β_2 -globulina con peso molecular 50 kDa que se encuentra en el plasma en concentración aproximada de 200 μ g/mL. Se descubrió que β_2 GPI interviene en la regulación de la coagulación de la sangre, inhibiendo la vía intrínseca. *In vivo*, la β_2 GPI está asociada a sustancias de carga negativa, por ejemplo fosfolípidos aniónicos, heparina y lipoproteínas. La región que liga los fosfolípidos está ubicada en su quinto dominio. Con el acrónimo "aPL" (anticuerpos anti-fosfolípidos) se identifican impropriamente anticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa como la cardiolipina (CL), la fosfatidil serina (PS), el fosfatil inositol (PI) y el ácido fosfatídico (PA); según una acepción más correcta del término, se

entiende por anticuerpos anti-fosfolípidos aquellos anticuerpos dirigidos contra el complejo formado por la β_2 GPI y los fosfolípidos aniónicos capaces de ligarse al dominio quinto de la β_2 GPI. De éstos, la cardiolipina es el fosfolípido utilizado más frecuentemente como antígeno para dosificar los aPL con el método ELISA. En el laboratorio clínico se miden los anticuerpos contra el complejo de β_2 GPI y fosfolípidos de carga negativa, tales como fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI) y ácido fosfatídico (PA).

Algunos investigadores sugieren que el empleo de la PS en lugar de la cardiolipina en los ensayos ELISA permitiría un diagnóstico más exacto. Sin embargo, estos anticuerpos anti-fosfolípidos se utilizan con menos frecuencia aunque su empleo puede aumentar la sensibilidad clínica en las muestras de pacientes en que se sospecha la síndrome anti-fosfolipídica, pero no pueden reemplazar la determinación de los autoanticuerpos anti-cardiolipina.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de detección de anti-fosfolípidos se basa en el ligado de los anticuerpos presentes en el suero contra los complejos antigénicos formados por fosfolípidos aniónicos (cardiolipina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, fosfatidil colina, lisofosfatidil colina y fosfatidil etanolamina) y la β_2 glicoproteína; estos complejos están inmovilizados en la microplaca. Los anticuerpos de tipos IgG e IgM dirigidos contra estos antígenos, presentes en los calibradores, controles y muestras de suero o plasma diluidas de pacientes, se ligan a sus respectivos antígenos. Tras 60 minutos de incubación, se lava la microplaca con solución de lavado para eliminar los componentes del suero inactivos. Una solución de inmunoglobulinas anti-humanas IgG (IgG conjugado, reactivo 4) o anti-humano IgM (IgM Conjugado, reactivo 5) reconoce la IgG o IgM (respectivamente) unido a los antígenos inmovilizados.

Tras 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático no ligado específicamente se elimina mediante lavado con solución de lavado. A continuación se añade una solución sustrato cromogénica que contiene tetrametilbenzidina (sustrato TMB). Se incuba 15 minutos y se para el desarrollo del color añadiendo la solución de parada. El color de la solución se vuelve amarillo y la intensidad de color desarrollada es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG o IgM de la muestra original.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%, suero humano

CAL0 **REF DCE002/11406-0**

CAL1 **REF DCE002/11407-0**

CAL2 **REF DCE002/11408-0**

CAL3 **REF DCE002/11409-0**

CAL4 **REF DCE002/11410-0**

2. Controles (2 frascos, 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%, suero humano

Control negativo **REF DCE045/11401-0**

Control positivo **REF DCE045/11402-0**

3. Diluyente de muestra (1 frasco, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugado IgG (1 frasco, 15 mL)

Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP),

BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/11402-G**

5. Conjugado IgM (1 frasco, 15 mL)

Anti h-IgM conjugado con peroxidasa de rabano (HRP),

BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% **REF DCE002/11402-M**

6. Microplaca recubierta

(1 microplaca rompible con el complejo antigénico de fosfolípidos y 2 glicoproteína adsorbidos)

REF DCE002/11403-0

7. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE004-0

8. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

0,15M ácido sulfúrico (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE005-0

9. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 6 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y lo control positivo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN₃) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugado y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso**. Para tal fin, Dia.Metra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas lean las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Los Calibradores están listos para usar y son mixtos, es decir, contienen tanto los anticuerpos IgG como IgM. Los Calibradores están listos para usarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación de la muestra

Para realizar el ensayo se pueden usar muestras de suero o plasma humano. Las muestras que se van a usar deben estar limpias. Se recomienda evitar la contaminación por hiperlipemia, aunque esta no interfiera con el análisis. Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante 5 días, o a -20°C hasta 6 meses. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras de suero o plasma, puesto que esto podría provocar una pérdida variable de la actividad de los autoanticuerpos. No se recomienda el análisis de muestras inactivadas por calor.

Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras. por ejemplo 10 µL de suero o plasma pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Los controles están listos para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada frasco de solución de lavado tamponada concentrada (10x) con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de

cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado (IgG o IgM)	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C). Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Sustrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), en la oscuridad.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

- Los controles positivo y negativo deben incluirse cada vez que se realice el ensayo para asegurar que todos los reactivos y el ensayo funcionen de forma correcta.
- Puesto que los controles están prediluidos, no representan un control de procedimiento para las técnicas de dilución usadas para las muestras.
- Se pueden preparar sueros de control adicionales recogiendo un pool de sueros humanos, dividiéndolo en alícuotas y conservándolo a < -20 °C.
- Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, se deben cumplir todos los criterios siguientes. Aunque solo uno no se encuentre dentro de los valores especificados, los resultados no deberán considerarse válidos y el ensayo deberá repetirse:
 - La absorbancia del control positivo debe ser mayor que la del control negativo.
 - El control negativo y el positivo sirven para controlar un eventual malfuncionamiento de los reactivos y no aseguran la precisión en correspondencia con el valor límite del ensayo.
 - El ensayo es válido solo si la densidad óptica a 450 nm del control negativo y del control positivo, así como las de los calibradores (C₀-C₄), coinciden con los intervalos correspondientes indicados en el Certificado de control de calidad incluido en el kit.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Para Anti Phospholipid Screen, el método de elección para el tratamiento de los resultados es un procesamiento de 4 parámetros con ejes lin-log para la densidad óptica y la concentración respectivamente. Además, se pueden usar una aproximación spline y coordenadas log-log. Sin embargo, se recomienda usar una curva Lin-Log. En primer lugar, calcular la media de las densidades ópticas relativas a los calibradores. Usar una hoja de papel lin-log y trazar las densidades ópticas medias de cada calibrador frente a la respectiva concentración. Dibujar la curva que mejor se aproxime a todos los puntos de calibración. Los puntos de los calibradores también pueden unirse con segmentos de línea recta. La concentración de las muestras desconocidas puede determinarse por interpolación de la curva de calibración.

9. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo Anti-Phospholipid Screen:

	IgG (GPL AU/mL)	IgM (MPL AU/mL)
Normal	< 10	< 10
Alto	10	10

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de anticuerpos anti-fosfolípidos sérica.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

La presencia en la muestra de complejos inmunes o de otros agregados de inmunoglobulinas puede dar lugar a reacciones no específicas con resultados falsos positivos.

11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

11.1. Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad se evaluaron analizando ocho duplicados de dos muestras positivas en dos ensayos diferentes con dos lotes de kits diferentes.

La dispensación y el lavado las efectuó manualmente un operador.

Los resultados de desviación Calibración y coeficiente de variación se indican a continuación:

Muestra	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-ensayo	1.03	5.9	1.31	7.4
Entre-ensayos	0.26	9.2	5.25	11.7
Muestra	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-ensayo	0.61	7.6	1.97	5.9
Entre-ensayos	0.15	7.1	2.98	6.6

11.2. Sensibilidad

La sensibilidad clínica del ensayo anti-fosfolípidos IgG es de 92,3%.

La sensibilidad clínica del ensayo anti-fosfolípidos IgM es un 68,8%.

11.3. Especificidad

La especificidad clínica del ensayo anti-fosfolípidos IgG es de 84,6%.

La especificidad clínica del ensayo anti-fosfolípidos IgM es un 100%.

11.4. Límite de detección:

La concentración mínima que puede distinguirse del Calibración cero es de aproximadamente 0,03 AU/mL para IgG y 0,16 AU/mL para IgM.

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumat. 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. Clin. Exp. Immunol. 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. Zeitschrift für Klinische Medizin 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. Blood, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.

DCM114-7

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs