



DCM110-4
Ed. 09/2018

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG

per analisi di routine

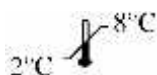
Determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro la 2-Glicoproteina 1 nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO110

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG è un test immunoenzimatico (ELISA) indiretto in fase solida sviluppato per la determinazione quantitativa degli anticorpi di classe IgG diretti contro la 2 - Glicoproteina 1, presenti nel siero o plasma umano.

Il kit Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La sindrome da antifosfolipidi (APS) è una patologia che manifesta una sintomatologia peculiare: trombosi arteriosa e venosa, trombocitopenia, ulcere agli arti inferiori, anemia emolitica, perdita del feto in caso di gravidanza, ed è associata alla presenza di anticorpi antifosfolipidi. Gli anticorpi antifosfolipidi rappresentano un gruppo ampio ed eterogeneo di immunoglobuline, che includono gli anticorpi anticardiolipina e l'anticoagulante lupico. I primi vengono diagnosticati in base alla loro reattività con la cardiolipina od altri fosfolipidi anionici nei test immunoenzimatici, mentre il secondo viene rilevato nei test fosfolipide-dipendenti della coagulazione (aPTT, KCT, dRVVT).

All' inizio degli anni '90 fu osservato che gli anticorpi antifosfolipidi non sono diretti contro i fosfolipidi anionici, come per lungo tempo si era ritenuto, ma reagiscono con proteine plasmatiche legate alle superfici (fosfolipidiche) anioniche. Infatti per quanto riguarda la cardiolipina, si osservò che per il legame degli anticorpi era necessario un cofattore, identificato nella 2 Glicoproteina 1 (2-GP1). La

2 Glicoproteina 1 è una glicoproteina plasmatica del peso molecolare di 50 kD, che si trova per il 40% complessata alle lipoproteine. Un paziente con sospetto clinico di APS e anticorpi anti-beta2GP1, anche in assenza di positività del LAC o degli anticorpi anti-Cardiolipina ha una forte probabilità di avere la sindrome da antifosfolipidi in quanto questi anticorpi riconoscono la 2-GP1 legata alla superficie del fosfolipide (cardiolipina). Queste proteine sembrano esprimere la loro antigenicità solo in seguito al contatto con particolari superfici anioniche come la superficie fosfolipidica o le superfici di plastica molto idrofiliche.

L'importanza dei test ELISA per gli anti-fosfolipidi, tra i quali anche per la 2-GP1, risiede quindi nel fatto che la positività al test se associata ad uno o più dei sintomi caratteristici può confermare una diagnosi di APS.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG si basa sul legame iniziale degli anticorpi presenti nei calibratori, nei controlli o nei campioni prediluiti dei pazienti con la 2-glicoproteina 1 adsorbita sulla micropiastra. Dopo 60 minuti di incubazione la micropiastra viene lavata con tampone di lavaggio per la rimozione delle componenti del siero che non hanno reagito. Successivamente una soluzione di

immunoglobuline anti-human IgG coniugate con perossidasi di rafano (HRP) riconosce gli anticorpi di classe IgG legati agli antigeni immobilizzati. Dopo 30 minuti di incubazione l'eccesso di coniugato enzimatico che non si è legato specificamente viene rimosso mediante tampone di lavaggio. Infine si aggiunge ai pozzetti una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo 15 minuti di incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della soluzione stop. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG presenti nel campione originale. La concentrazione di anticorpi IgG 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 DCE002/11006-0

CAL1

REF DCE002/11007-0

CAL2

REF DCE002/11008-0

CAL3

REF DCE002/11009-0

CAL4

REF DCE002/11010-0

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

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

Controllo Negativo

REF DCE045/11001-0

Controllo Positivo

REF DCE045/11002-0

3. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1 M NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anti human-IgG coniugato con perossidasi, BSA 0,1%,

Proclin < 0,0015%

REF DCE002/11002-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Beta-2-Glycoproteina 1 adsorbita su micropiastra

REF DCE002/11003-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE005-0

8. 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 $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (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.
- 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.
- 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.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) 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 $\text{TMB}/\text{H}_2\text{O}_2$ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- 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 $2-8^{\circ}\text{C}$ 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 del kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) 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)

Dal momento che non sono disponibili preparazioni di riferimento internazionale per gli anticorpi anti- 2GP1, il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	10	20	40	160

Una volta aperti sono stabili 6 mesi a $2-8^{\circ}\text{C}$.

6.2. Preparazione del campione

Le matrici di elezione per la determinazione degli anticorpi anti- 2GP1 sono siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent**; per esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare.

Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8°C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Emolisi e presenza di bilirubina non hanno effetti evidenti sulla determinazione.

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.

Reagente	Calibrator	Campione /Controlli	Bianco
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 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	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 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 al buio a temperatura ambiente (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.			

8. RISULTATI

8.1. Curva di calibrazione

Per il test Anti-Beta2 Glycoprotein 1 IgG 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.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-Beta2 Glycoprotein 1 IgG. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
CAL0	0.014	0.014	0.014	0.00	0.00	0.00	---
CAL1	0.297	0.302	0.300	9.91	10.09	10.00	1.22
CAL2	0.588	0.598	0.593	19.83	20.17	20.00	1.22
CAL3	1.101	1.141	1.121	39.16	40.85	40.01	3.00
CAL4	2.501	2.390	2.446	171.6	148.5	160.1	10.22

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 beta 2 Glycoprotein 1 IgG:

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG (AU/mL)	
Negativo	< 20
Positivo	> 20

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 Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG sierica.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Specificità

Test di correlazione contro due analoghi kit commerciali di riferimento, effettuati su 41 sieri (di cui 14 positivi e 27 negativi) hanno mostrato una specificità del 90% (il primo) e del 95.8% (il secondo).

10.2. Sensibilità

Test di correlazione contro due analoghi kit commerciali di riferimento, effettuati su 41 sieri (di cui 14 positivi e 27 negativi) hanno mostrato una sensibilità >99% (il primo) e del 76.5% (il secondo).

10.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-Beta 2 Glicoproteina I che può essere distinta dal Calibratore 0 è di circa 0.47 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

10.4. Precisione e riproducibilità

10.4.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 12 volte tre diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è 7,0%

10.4.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-Assay è 10,4%.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

- Hughes GRV. The antiphospholipid Syndrome. Ten years on. *Lancet* 1993; 342; 341-344.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
- Mc Neil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β 2-Glycoprotein 1 (Apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4120-4.
- Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336:177-8
- Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β 2-glycoprotein 1 is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995;73:29-34
- Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein 1 as an antigen. *J Immunol Methods* 1991;143:223-9.
- Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Kobayashi S, Koike T. Antibodies to β 2-glycoprotein 1 and clinical manifestation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:1466-74.
- Pengo V, Biasiolo A. The risk of overdiagnosis of antiphospholipid antibody syndrome. *Throm Haemost* 2001;86:933 (letter).

Ed. 09/2018

DCM110-4

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM110-4
Ed. 09/2018

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG

for routine analysis

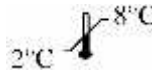
Quantitative determination of IgG class antibodies against 2-Glycoprotein 1 in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ test

REF DKO110

INTENDED USE

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG is an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit designed for the quantitative measurement of IgG class antibodies directed against the 2-Glycoprotein 1 in human serum or plasma. Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The antiphospholipid syndrome (APS) is a disorder that presents peculiar symptoms: arterial and venous thrombosis, thrombocytopenia, ulcers of the lower limbs, hemolytic anemia, loss of the fetus during pregnancy and is associated with the presence of antiphospholipid antibodies. Antiphospholipid antibodies represent a large and heterogeneous immunoglobulins group, including anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant. The former are diagnosed by on their reactivity with cardiolipin or other anionic phospholipids in ELISA test, while the latter is detected in phospholipid-dependent coagulation tests (aPTT, KCT, dRVVT).

In early '90s it was observed that antiphospholipid antibodies are not directed against anionic phospholipids, as long it was considered, but they react with plasma proteins bound to anionic (phospholipidic) surfaces. In fact about cardiolipin, it was observed the need of a cofactor for antibodies binding, this cofactor was identified in 2 glycoprotein 1 (2-GP1). The 2 glycoprotein 1 is a plasma glycoprotein of molecular weight of 50 kD, which is complexed to lipoproteins for 40%. A patient with clinical suspicion of APS, who has an high titre of anti-beta2GP1 antibodies, even if LAC or anti-cardiolipin antibodies are negative, has a strong chance of having the antiphospholipid syndrome, because these antibodies recognize 2-GP1 bound to the surface of phospholipid (cardiolipin). These proteins seem to express their antigenicity only after contact with specific areas such as the anionic phospholipid surface or very hydrophilic plastic surfaces.

The importance of ELISA anti-phospholipids test, including the anti- 2-GP1 test, lies in the fact that a positive test if associated with one or more of the symptoms can confirm a diagnosis of APS.

2. PRINCIPLE

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG test is based on the initial binding of antibodies present in calibrators, controls or pre-diluted patient samples to the beta 2 Glycoprotein 1 coated on the inner surface of the microplate wells. After a 60 minutes incubation the microplate is washed with a wash buffer to remove the non-reactive serum components. Then an anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugated solution recognizes the IgG class antibodies bound to the immobilized antigens. After a 30 minutes

incubation the excess of enzyme conjugate, which is not specifically bound, is washed away with a wash buffer.

Finally a chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells. After 15 minutes of incubation colour development is stopped by adding the stop solution. The solution turns yellow at this point. The level of colour is directly proportional to the concentration of IgG antibodies present in the original sample.

The concentration of IgG antibodies present in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1,2 mL each)

Phosphate buffer 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, human serum

CAL0

REF DCE002/11006-0

CAL1

REF DCE002/11007-0

CAL2

REF DCE002/11008-0

CAL3

REF DCE002/11009-0

CAL4

REF DCE002/11010-0

2. Controls (2 vials, 1,2 mL each, ready to use)

Phosphate buffer 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, human serum

Negative Control

REF DCE045/11001-0

Positive Control

REF DCE045/11002-0

3. Sample diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 0,1 M $\text{NaN}_3 < 0,1\%$

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Anti human-IgG conjugate with peroxidase, BSA 0,1%,

Proclin $< 0,0015\%$

REF DCE002/11002-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with Beta 2-Glycoprotein 1

REF DCE002/11003-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0,15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2. Necessary Reagents 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 5 (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.
- 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.
- 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.
- 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 the Calibrators (C₀...C₄)

Since no international reference preparation for anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG antibodies is available, the assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	10	20	40	160

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

6.2. Preparation of the Sample

For determination of anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG antibodies human serum or plasma are the preferred sample matrixes.

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

The patients need not to be fasting, and no special sample preparation is necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2-8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples

should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted. Neither Bilirubin nor Hemolysis have significant effect on the procedure. The controls are ready for use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

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 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.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	

Incubate for 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents 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	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents 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 for 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.			

8. RESULTS

8.1. Calibration curve

For Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG 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 a Lin-Log plot is recommended.

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.

Typical results (for example only):

the table below shows typical results for Anti- 2 glycoprotein 1 IgG. The data are for illustration only and should not be used to calculate the results.

N	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
CAL0	0.014	0.014	0.014	0.00	0.00	0.00	---
CAL1	0.297	0.302	0.300	9.91	10.09	10.00	1.22
CAL2	0.588	0.598	0.593	19.83	20.17	20.00	1.22
CAL3	1.101	1.141	1.121	39.16	40.85	40.01	3.00
CAL4	2.501	2.390	2.446	171.6	148.5	160.1	10.22

9. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG test:

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG (AU/mL)	
Negative	< 20
Positive	> 20

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 on an individual patient basis.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of seric anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Specificity

Test against two commercial reference kits, performed on 41 sera (including 14 positive and 27 negative) showed a specificity of 90% (the first one) and of 95.8% (the second one).

10.2. Sensitivity

Test against two commercial reference kits, performed on 41 sera (including 14 positive and 27 negative) showed a sensitivity >99% (the first one) and of 76.5% (the second one).

10.3. Detection limit

The lowest concentration of anti-beta 2 glycoprotein 1, which can be distinguished from zero Calibrator is about 0.47 AU/mL with confidence limit of 95%.

10.4. Precision and Reproducibility

10.4.1. Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 12 times three different sera with values in the range of calibration curve. The within assay variability is 7.0%

10.4.2. Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate the measurements of two different control sera with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is 10.4%.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Hughes GRV. The antiphospholipid Syndrome. Ten years on. *Lancet* 1993; 342; 341-344.
2. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
3. Mc Neil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β 2-Glycoprotein 1 (Apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4120-4.
4. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336:177-8
5. Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β 2-glycoprotein 1 is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995;73:29-34
6. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein 1 as an antigen. *J Immunol Methods* 1991;143:223-9.
7. Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Kobayashi S, Koike T. Antibodies to β 2-glycoprotein 1 and clinical manifestation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:1466-74.

8. Pengo V, Biasiolo A. The risk of overdiagnosis of antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Haemost* 2001;86:933 (letter).

Ed. 09/2018

DCM110-4

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM110-4
Ed. 09/2018

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG

para análisis de rutina

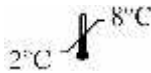
Determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra la 2-glicoproteína 1 en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO110

USO PREVISTO

El kit Anti-Beta2 glicoproteína 1 IgG es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA) desarrollado para la determinación cuantitativa de los anticuerpos de clase IgG directos contra la 2-glicoproteína 1, presentes en el suero o plasma humano. El kit Anti-beta 2 Glycoprotein IgG está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una patología que manifiesta una sintomatología peculiar: trombosis arterial y venosa, trombocitopenia, úlceras en los miembros inferiores, anemia hemolítica, pérdida del feto en caso de embarazo, y se asocia a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos. Los anticuerpos antifosfolípidos representan un grupo amplio y heterogéneo de inmunoglobulinas, que incluye los anticuerpos anticardiolipina y anticoagulante lúpico. Los primeros se diagnostican sobre la base de su reactividad con la cardiolipina u otros fosfolípidos aniónicos en los ensayos inmunoenzimáticos, mientras que el segundo se detecta en los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos (aPTT, KCT, dRVVT).

A principios de años 90 se observó que los anticuerpos antifosfolípidos no estaban dirigidos contra los fosfolípidos aniónicos, como se había creído durante mucho tiempo, sino que reaccionaban con las proteínas plasmáticas unidas a las superficies (fosfolípicas) aniónicas. De hecho, con respecto a la cardiolipina, se observó que para la unión de los anticuerpos se necesitaba un cofactor, identificado en la 2 glicoproteína 1 (2-GP1). La 2 glicoproteína 1 es una glicoproteína plasmática de peso molecular 50 kDa, que se encuentra en el 40% en complejos con lipoproteínas. Un paciente con sospecha clínica de SAF y anticuerpos anti-beta2GP1, incluso en ausencia de positividad del LAC o de los anticuerpos anticardiolipina, tiene una alta probabilidad de tener el síndrome antifosfolípido, ya que estos anticuerpos reconocen la 2-GP1 unida a la superficie del fosfolípido (cardiolipina). Estas proteínas parecen expresar su antigenicidad solo después del contacto con superficies aniónicas específicas, como la superficie fosfolípica o las superficies de plástico muy hidrofílicas.

La importancia de los ensayos ELISA para los antifosfolípidos, y entre estos también para la 2-GP1, reside por lo tanto en el hecho de que la positividad en el ensayo asociada a uno o varios de los síntomas característicos puede confirmar un diagnóstico de SAF.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti-Beta2 glicoproteína 1 IgG se basa en la unión de los anticuerpos presentes con la 2- glicoproteína 1 absorbida en la microplaca. Los anticuerpos presentes en los calibradores, los controles o las muestras prediluidas se unen a la superficie interna de los pocillos.. Tras 60 minutos de incubación, la microplaca se lava con un tampón de lavado para retirar los componentes del suero que no han reaccionado. Una solución de inmunoglobulinas anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa reconoce los anticuerpos de clase IgG unidos a los antígenos inmovilizados. Tras 30 minutos de incubación, el exceso de conjugado enzimático que no se ha unido específicamente se retira mediante el tampón de lavado. Se añade a los pocillos una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB. Tras 15 minutos de incubación se bloquea el desarrollo del color mediante la adición de la solución de parada. El color de la solución se vuelve amarillo. La cantidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG presentes en la muestra original. La concentración de anticuerpos IgG en la muestra se calcula según una curva de calibración.

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 DCE002/11006-0

CAL1

REF DCE002/11007-0

CAL2

REF DCE002/11008-0

CAL3

REF DCE002/11009-0

CAL4

REF DCE002/11010-0

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

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

Control negativo

REF DCE045/11001-0

Control positivo

REF DCE045/11002-0

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

Tampón fosfato 0,1 M, NaN₃ < 0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugado (1 frasco, 15 mL)

Anti IgG humana conjugado con peroxidasa da rabano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015%

REF DCE002/11002-0

5. Microplaca recubierta

(1 microplaca rompible con beta 2 glicoproteína 1 absorbida)

REF DCE002/11003-0

6. **Substrato TMB** (1 frasco, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)
REF DCE004-0
7. **Solución de parada** (1 frasco, 15 mL)
 Ácido sulfúrico 0,15M (evitar el contacto con la piel)
REF DCE005-0
8. **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).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 5 (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, 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 los controles positivo y negativo 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 y 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/ H_2O_2 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 substrato 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 leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

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

Puesto que no hay disponibles preparados de referencia internacional para los anticuerpos anti- 2GP1, el sistema de medición se calibra en unidades relativas arbitrarias. Los Calibradores tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	10	20	40	160

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

6.2. Preparación de la muestra

Las matrices de elección para la determinación de los anticuerpos anti- 2GP1 son suero o plasma humano. **Todas las muestras de suero o plasma deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestra;** por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Los pacientes no deben necesariamente estar en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial. Recoger la sangre mediante extracción venosa en un Vacutainer y separar el suero (tras la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugado.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, las muestras deberían dividirse en alícuotas. La hemólisis y la presencia de bilirrubina no tienen efectos evidentes en la determinación. Los controles son listo para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 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 en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales con el lavado del frasco 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.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Controles	Blanco
Calibradores C ₀ -C ₄	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C). Retirar el contenido de cada pocillo 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	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (22-28 °C).			
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 dentro de los 5 minutos.			

7. RESULTADOS

7.1. Curva de calibración

Para el ensayo Anti beta 2 Glicoproteína 1 IgG, 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.

Resultados típicos (se deben considerar solo como ejemplo)

La tabla que aparece a continuación muestra los resultados típicos para el ensayo Anti-Beta2 glicoproteína 1 IgG. Los datos se proporcionan como ejemplo y no deben utilizarse para calcular los resultados.

N	DO1	DO2	promedio	C1	C2	promedio	C.V.%
CAL0	0.014	0.014	0.014	0.00	0.00	0.00	---
CAL1	0.297	0.302	0.300	9.91	10.09	10.00	1.22
CAL2	0.588	0.598	0.593	19.83	20.17	20.00	1.22
CAL3	1.101	1.141	1.121	39.16	40.85	40.01	3.00
CAL4	2.501	2.390	2.446	171.6	148.5	160.1	10.22

8. 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 beta 2 Glicoproteína 1 IgG:

Anti beta 2 Glycoprotein 1 IgG (AU/mL)	
Negativo	< 20
Positivo	> 20

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 anti- 2-GP1 IgG sérico.

9. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

9.1. Especificidad

Ensayos de correlación frente a dos kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 41 sueros (14 positivos y 27 negativos) han mostrado una especificidad del 90% y del 95,8%.

9.2. Sensibilidad

Ensayos de correlación frente a dos kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 41 sueros (14 positivos y 27 negativos) han mostrado una sensibilidad >99% y del 76,5%.

9.3. Límite de detección

La concentración mínima de anti beta 2 glicoproteína 1 que puede distinguirse del Calibrador cero es de 0,47 AU/mL con un límite de confianza del 95%.

9.4. Precisión

9.4.1. Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (12x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 7.0%.

9.4.2. Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo dos niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 10.4%.

10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Hughes GRV. The antiphospholipid Syndrome. Ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-344.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
- Mc Neil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β 2-Glycoprotein 1 (Apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4120-4.
- Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336:177-8
- Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β 2-glycoprotein 1 is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995;73:29-34
- Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein 1 as an antigen. *J Immunol Methods* 1991;143:223-9.
- Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Kobayashi S, Koike T. Antibodies to β 2-glycoprotein 1 and clinical manifestation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:1466-74.
- Pengo V, Biasiolo A. The risk of overdiagnosis of antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Haemost* 2001;86:933 (letter).

Ed. 09/2018

DCM110-4

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	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 Establa 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