

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Phospholipid Screen IgG/IgM ELISA

Enzyme immunoassay for quantitative determination of IgG and IgM autoantibodies against Cardiolipin, Phosphatidyl serine, Phosphatidyl inositol, Phosphatidic acid and Beta-2-Glycoprotein I in human serum or plasma.



DE7470



96 wells

1. INTENDED PURPOSE

Phospholipid Screen IgG/IgM is an ELISA test system to screen for the presence of IgG and IgM class autoantibodies against cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid and beta-2-glycoprotein I in human serum or plasma. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

Antiphospholipid syndrome (APS, Hughes Syndrome) is a systemic autoimmune disease that causes thromboses, recurrent miscarriage or stillbirths, and stroke. Clinical symptoms are accompanied by specific autoantibodies in the blood, which bind to phospholipids like cardiolipin, or phospholipid-binding proteins like beta-2-glycoprotein I. Autoantibodies against proteins of the coagulation cascade, e.g. prothrombin or annexin V may also be found in patients with APS with otherwise negative phospholipid antibody results. In primary APS autoantibodies against phospholipids appear independently, while in secondary APS phospholipid antibodies are detected in conjunction with other autoimmune diseases, such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, or Sjögren's syndrome.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

A mixture of highly purified cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid and human beta2-Glycoprotein I is bound to microwells.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps: Specific antibodies in the patient sample bind to the antigen coated on the surface of the reaction wells. After incubation, a washing step removes unbound and unspecifically bound serum or plasma components. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. After addition of substrate solution the bound enzyme conjugate hydrolyses the substrate forming a blue coloured product. Addition of an acid stops the reaction generating a yellow end-product. The intensity of the yellow color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 450 nm.

3. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- Stop solution contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, calibrators, sample buffer and wash solution contain sodium azide (NaN₃) 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.
- Enzyme conjugate contains ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety regulations and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex.
 - Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control sera.

4. CONTENTS OF THE KIT

Sufficient for 96 determinations

SORB **MT** 1 **divisible microplate** consisting of 12 modules of 8 wells each. Ready to use.

CAL **A-F** 6x 1.5 ml **Calibrator A-F** (0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 U/ml), containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use.

CONTROL **1** & **2** 2x 1.5 ml **Control positive (1) and negative (2)**, containing phospholipid antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN₃ 0.09%), yellow. Ready to use. The concentration is specified on the certificate of analysis.

SAM **DIL** **5x** 20 ml **Sample Buffer P**, containing PBS, BSA, detergent, preservative NaN₃ 0.09%, yellow, 5x conc.

ENZ **CONJ** **IgG** 15 ml **Enzyme Conjugate**; containing anti-human IgG antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%, light red. Ready to use.

ENZ **CONJ** **IgM** 15 ml **Enzyme Conjugate**; containing anti-human IgM antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%, light red. Ready to use.

SUB **TMB** 15 ml **TMB Substrate**; containing 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin, colorless. Ready to use.

STOP **SOLN** 15 ml **Stop solution**; contains acid. Ready to use.

WASH **SOLN** **50x** 20 ml **Wash Buffer**, containing Tris, detergent, preservative NaN₃ 0.09%; 50 x conc.

1 Instruction for Use

1 Certificate of Analysis

5. MATERIALS REQUIRED

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm; optional: reference filter at 620 nm
- Data reduction software
- Multi-channel dispenser or repeatable pipette for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Distilled or deionised water
- Measuring cylinder for 1000 ml and 100 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

This ELISA assay is suitable for use on open automated ELISA processors. Each assay has to be validated on the respective automated system. Detailed information is provided upon request.

6. SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia should be avoided, but 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 or plasma samples. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated sera is not recommended

7. STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store microplate sealed and dessicated in the clip bag provided.
- Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and Sample Buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C.
- We recommend consumption on the same day.

8. PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- Do not interchange kit components from different lots and products.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- Prepare all reagents and samples. Once started, perform the test without interruption.
- Double determinations may be done. By this means pipetting errors may become obvious.
- Perform the assay steps only in the order indicated.
- Always use fresh sample dilutions.
- Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples and different kit controls.
- Wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer.
- All incubation steps must be accurately timed.
- Do not re-use microplate wells

9. PREPARATION OF REAGENTS

Wash Buffer

Dilute the contents of one vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionised water to a final volume of 1000 ml prior to use.

Sample Buffer

Sample Buffer P: Prior to use dilute the contents (20 ml) of one vial of sample buffer 5x concentrate with distilled or deionised water to a final volume of 100 ml.

Preparation of samples

Dilute patient samples 1:100 before the assay: Put 990 µl of prediluted sample buffer in a polystyrene tube and add 10 µl of sample. Mix well.

Note: Calibrators / Controls are ready to use and need not be diluted.

10. TEST PROCEDURE

Prepare enough microplate modules for all calibrators / controls and patient samples.

1. Pipette **100 µl** of calibrators, controls and prediluted patient samples into the wells.
2. Incubate for **30 minutes** at room temperature (20-28 °C).
3. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µl** of wash solution.
4. Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
5. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and **wash 3 times with 300 µl** of wash solution.
7. Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature
9. **Add 100 µl** of stop solution to each well of the modules
10. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
11. Read the optical density at 450 nm (reference 600-690nm) and calculate the results.
The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read during this time.

Example for a pipetting scheme:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								
	IgG	IgG	IgM	IgM								

P1, ... patient sample A-F calibrators C+, C- controls

11. VALIDATION

Test results are valid if the optical densities at 450 nm for calibrators / controls and the results for controls comply with the reference ranges indicated on the Certificate of Analysis enclosed in each test kit. If these quality control criteria are not met the assay run is invalid and should be repeated.

12. CALCULATION OF RESULTS

For quantitative results plot the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of patient samples may then be estimated from the calibration curve by interpolation. Using data reduction software a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Calibration

Calibration is related to the internationally recognised reference sera from E.N. Harris, Louisville and to IRP 97/656 (IgG) and HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Measuring range

The calculation range of this ELISA assay is

IgG: 0 - 100 GPL-U/ml

IgM: 0 - 100 MPL-U/ml

Expected values

In a normal range study with samples from healthy blood donors the following ranges have been established with this ELISA assay:

Cut-off

IgG: 10 GPL-U/ml

IgM: 10 MPL-U/ml

Interpretation of results

	Negative:	Positive:
IgG	< 10 GPL-U/ml	≥ 10 GPL-U/ml
IgM	< 10 MPL-U/ml	≥ 10 MPL-U/ml

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in sample buffer to demonstrate the dynamic range of the assay and the upper / lower end of linearity. Activity for each dilution was calculated from the calibration curve using a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates.

Sample	Dilution Factor	Observed GPL/MPL-U/ml	Expected GPL/MPL-U/ml	O/E %
IgG 1	1:100	98.0	98.4	100
	1:200	49.6	49.2	101
	1:400	24.3	24.6	99
	1:800	12.0	12.3	98
	1:1600	5.8	6.2	94
IgG 2	1:100	92.4	92.4	100
	1:200	45.9	46.2	99
	1:400	22.7	23.1	98
	1:800	11.4	11.6	99
	1:1600	5.4	5.8	94
IgM 1	1:100	92.7	92.7	100
	1:200	45.7	46.4	99
	1:400	22.8	23.2	98
	1:800	11.2	11.6	97
	1:1600	5.4	5.8	93
IgM 2	1:100	72.4	74.2	100
	1:200	36.5	37.1	98
	1:400	18.7	18.6	101
	1:800	8.9	9.3	96
	1:1600	4.4	4.6	95

Limit of detection

Functional sensitivity was determined to be:

IgG: 0.5 GPL-U/ml

IgM: 0.5 MPL-U/ml

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three samples from the results of 6 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.4	5.1
2	18.7	3.4
3	59.9	5.2

Inter-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.0	3.6
2	17.7	5.4
3	57.9	4.9

Intra-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.8	4.1
2	30.8	3.5
3	63.8	3.7

Inter-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.6	5.3
2	31.9	4.1
3	62.1	4.2

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparin). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

Study results

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	7	87.5	6	75.0
Secondary APS	65	60	92.3	33	50.8
Normal human sera	150	4	2.7	5	33

Clinical Diagnosis

IgG	Pos	Neg
Pos	67	4
Neg	6	146
	73	150
		223

Clinical Diagnosis

IgM	Pos	Neg
Pos	39	5
Neg	34	145
	73	150
		223

Sensitivity: 91.8 %
 Specificity: 97.3 %
 Overall agreement: 95.5 %

Sensitivity: 53.4 %
 Specificity: 96.7 %
 Overall agreement: 82.5 %

14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

The above pathological and normal reference ranges for antibodies in patient samples should be regarded as recommendations only. Each laboratory should establish its own ranges according to ISO 15189 or other applicable laboratory guidelines.

1. FINALIDAD PREVISTA

Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM es una prueba ELISA para la cuantificación de anticuerpos tipo IgG e IgM frente a cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, beta-2-glycoprotein I en muestras de suero humano o plasma. Este producto se ha concebido exclusivamente para su uso profesional en el diagnóstico in vitro.

El síndrome antifosfolípido (SAFL, síndrome de Hughes) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que provoca trombosis, aborto espontáneo recurrente o muertes fetales y accidentes cerebrovasculares. Los síntomas clínicos van acompañados por unos autoanticuerpos específicos en sangre, que se unen a los fosfolípidos como cardiolipina, o proteínas que se unen a los fosfolípidos como beta-2-glicoproteína I. Los autoanticuerpos contra las proteínas de la cascada de coagulación, p. ej. protrombina o anexina V también pueden encontrarse en pacientes con SAFL que por el contrario tienen resultados de anticuerpos fosfolípidos negativos. En los autoanticuerpos SAFL primarios contra los fosfolípidos aparecen independientemente, mientras que en los anticuerpos de fosfolípidos SAFL secundarios se detectan junto con otras enfermedades autoinmunitarias, tal como lupus eritematoso, artritis reumatoide o síndrome de Sjögren.

2. METODOLOGÍA

Los pocillos de la microplaca están recubiertos con cardiolipin, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid altamente purificada y saturados con beta-2-glycoproteína I. La determinación se basa en una reacción inmunológica indirecta ligada a enzimas con los pasos siguientes: los anticuerpos presentes en muestras positivas se ligan al antígeno revestido en la superficie de los dos pocillos de reacción formando un complejo antígeno-anticuerpo. Tras la incubación, un primer paso de lavado elimina las moléculas no ligadas y las moléculas ligadas no específicas. El conjugado de enzima añadido a continuación se liga al complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado. Tras la incubación, un segundo paso de lavado elimina el conjugado de enzimas no ligado. La adición de la solución de sustrato de enzimas tiene como resultado la hidrólisis y el desarrollo del color durante la incubación. La adición de un ácido detiene la reacción de formación de un color amarillo del producto final. La intensidad del color amarillo guarda relación con la concentración del complejo anticuerpo-antígeno y puede medirse fotométricamente a 450 nm.

3. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todos los reactivos de este kit son para su uso profesional para el diagnóstico in vitro.
- Se han analizado todos los componentes que contienen suero humano y el resultado ha sido negativo para los métodos autorizados de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2. Sin embargo, las pruebas no pueden garantizar la ausencia de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2, por lo que todos los reactivos basados en suero humano en este juego se deben manejar como si fuesen contagiosos.
- Se le ha realizado la prueba de EEB a la albúmina de suero bovino (ASB) usada en los componentes y el resultado ha sido negativo.
- Evite el contacto con el sustrato TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbencidina).
- Solución de paro contiene ácido, cuya clasificación es de no peligrosa. Evite el contacto con la piel.
- Los tampones de control, de muestra y de lavado contienen 0.09% de ácido de sodio como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.
- Las enzimas conjugadas contienen 0.05% PROCLIN como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.

Durante el tratamiento de todos los reactivos, de los controles y de las muestras de suero cumpla con la regulación vigente en materia de seguridad en el laboratorio y con las buenas prácticas de laboratorio:

- Medidas de primeros auxilios: en caso de contacto con la piel, lave cuidadosamente la zona con agua y jabón. Quítese la ropa y el calzado contaminado y lávelos antes de volverlos a utilizar. Si la piel entra en contacto con los fluidos del sistema, lave la zona cuidadosamente con agua. En caso de contacto con los ojos, aclare con cuidado el ojo abierto con agua corriente durante al menos 10 minutos. En el caso de que sea necesario, consulte a un médico.
- Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia:
Siga las regulaciones en materia de seguridad en el laboratorio. Evite el contacto con la piel y los ojos. No ingiera el producto. No pipetee nunca con la boca. No coma, beba, fume ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se trabaja con las muestras o con los reactivos del juego. En el caso de derrame, absorba el producto con un material inerte y elimine el producto derramado como corresponda.
- Controles de exposición/ protección personal: utilice guantes de protección de caucho de nitrilo o de látex natural. Use gafas de protección. No se conocen reacciones peligrosas si se usa conforme a su fin.
- Condiciones que se deben evitar: la solución de sustrato es sensible a la luz, se deben almacenar en un lugar oscuro.
- Siga la normativa nacional o regional para eliminar los desechos del laboratorio.

Siga las directrices en materia de realización de controles de calidad en laboratorios médicos mediante controles de ensayo.

4. CONTENIDO DEL KIT

Válido para 96 determinaciones

1. **SORB MT 1 Microplaca fraccionable** compuesta por 12 tiras de 8 pocillos cada una. Listo para el. Código de producto de microplaca: PSC
2. **CAL A-F 6x 1.5 ml Calibrador A-F** (0, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 U/ml); contiene phospholipid anticuerpos en una matriz sérica tamponada (PBS, BSA, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%). Listo para el uso.
3. **CONTROL 1 & 2 2x 1.5 ml Control positiva (1) y negativa (2)**; contiene phospholipid anticuerpos en una matriz sérica tamponada PBS, BSA, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%). Listo para el uso. Concentraciones especificadas en certificado de análisis.
4. **SAM DIL 5x 20 ml Tampón de muestra P**: amarillo, contiene PBS, BSA, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%; 5x concentrado.
5. **ENZ CONJ IgG 15 ml Conjugado**; rojo claro; contiene anticuerpos contra la IgG humanas, marcados con HRP; PBS, BSA, detergente, conservante PROCLIN 0.05%. Listo para el uso.
6. **ENZ CONJ IgM 15 ml Conjugado**; rojo claro; contiene anticuerpos contra la IgM humanas, marcados con HRP; PBS, BSA, detergente, conservante PROCLIN 0.05%. Listo para el uso.
7. **SUB TMB 15 ml TMB solución de sustrato**; contiene 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina. Listo para el uso.
8. **STOP SOLN 15 ml Solución de paro**; contiene ácido. Listo para el uso.
9. **WASH SOLN 50x 20 ml Solución de lavado**; contiene Tris, detergente, conservante ácido de sodio 0.09%; 50x conc.
10. **1 Instrucciones de uso**
11. **1 QC certificado**

5. EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO

- Lector de microplacas capaz de leer a punto final a 450 nm; opcional: referencia 620 nm
- Software para cálculo de resultados
- Pipeta multicanal, o de repetición para 100 µl
- Mezclador Vortex
- Micropipetas con jeringas de un solo uso para 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Reloj de laboratorio
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada para 1000 ml, 100 ml
- Contenedor de plástico para la solución de lavado diluida

Automatización

Este ensayo ELISA puede ser utilizado en procesadores automáticos abiertos ELISA. La aplicación tiene que ser validado en el sistema automatizado correspondiente. La información se proporciona bajo petición.

6. RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

- Las muestras de sangre se deben obtener en base a las directivas y regulaciones de vigencia actual.
- Dejar coagular la sangre y obtener el suero mediante centrifugación.
- Se debe prevenir la utilización de sueros hemolíticos, lipémicos e ictericos.
- Las muestras de suero y plasma pueden conservarse durante un período máximo de 5 días con refrigeración y temperaturas entre 2 a 8 °C. En caso de requerir una conservación más larga, se deben alicuotar las muestras y congelarse con una temperatura de -20 °C.
- Se ha de prevenir la repetida congelación y descongelación! Esto puede provocar una pérdida variable de actividad de los autoanticuerpos o anticuerpos.
- No se recomienda la utilización de sueros desactivados frente al calor.

7. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Almacene el kit a 2-8°C en un lugar oscuro.
- No exponga los reactivos al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.
- Almacene la microplaca sellada en la bolsa con pinza suministrada con un secante.
- Los reactivos sin abrir se mantienen estables hasta la fecha de caducidad del kit. Consulte las etiquetas de cada lote individual.
- Los tampones de lavado diluidos y tampón de muestra se mantienen estables durante al menos 30 días si se almacenan a 2-8°C. Recomendamos que se use en el mismo día.

8. NOTAS TECNICAS

- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No intercambiar componentes de diferentes lotes y productos.
- Todos los componentes deben ser acondicionados a temperatura ambiente antes de su uso (20-28°C).
- Preparar todos los reactivos y muestras antes de empezar el ensayo. Una vez iniciado es test debe realizarse sin interrupción.
- Determinaciones dobles puede realizarse. Por este medio los errores de pipeteo puede llegar a ser evidentes.
- Procesar todos los pasos del test en el orden indicado.
- Utilizar siempre las diluciones de muestra recién preparadas.
- Pipetear los reactivos y muestras en el fondo del pocillo.
- Para eliminar arrastre, cambiar las puntas de pipeta entre las muestras y los controles.
- Es importante lavar exhaustivamente los pocillos y eliminar las últimas gotas de tampón de lavado.
- Los tiempos de incubación deben controlarse cuidadosamente.
- Nunca deben reutilizarse los pocillos.

9. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de lavado

El contenido de cada botella del concentrado de solución de lavado (20 ml) debe diluirse mediante adición de agua ada para obtener un volumen final de 1000 ml (1 litro).

Tampon de muestra P

Antes de su uso, diluir el contenido (20 ml) del vial de tampón de muestras concentrado 5x a destilada o desionizada hasta un volumen final de 100 ml.

Preparación de las muestras

Antes de su uso en ensayo diluir las muestras de pacientes 1:100 con tampón de muestra: Ponga 990 µl de tampón de muestra prediluido en un tubo de poliestireno y se añaden 10 µl de muestra. Agitar bien.

Nota: Los controles se presentan listos para su uso y no deben ser diluidos.

10. PROCEDIMIENTO

Preparar el número de tiras de la microplaca suficiente para disponer los calibradores, controles y muestras prediluidas.

1. Pipetear **100 µl** de calibradores, controles y muestras prediluidas en los pocillos.
2. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (20-28 °C)
3. Vaciar los pocillos y **lavar 3 veces** con **300 µl** de solución de lavado.
4. Dispensar **100 µl** de conjugado en cada pocillo
5. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20-28 °C)
6. Vaciar los pocillos y **lavar 3 veces** con **300 µl** de solución de lavado.
7. Dispensar **100 µl** de sustrato TMB en cada pocillo
8. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (20-28 °C)
9. **Añadir 100 µl** de solución de paro a todos los pocillos
10. Incubar durante **5 minutos** a temperatura ambiente
11. Leer la densidad óptica a 450 nm (referencia 600-690 nm) y calcular los resultados. El color desarrollado en la reacción es estable durante 30 minutos. Leer durante este periodo.

Ejemplo de un esquema de pipeteo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1	A	P1								
B	B	P2	B	P2								
C	C	P3	C	P3								
D	D	P4	D	P4								
E	E	P5	E	P5								
F	F	P6	F	P6								
G	C+	P7	C+	P7								
H	C-	P8	C-	P8								
	IgG	IgG	IgM	IgM								

P1, ... Muestras A-F Calibrador C+, C- Control

11. VALIDACIÓN

El test se considera válido siempre que la densidad óptica a 450 nm del calibradores y controles y los resultados de los controles se ajuste al rango respectivo indicado en el certificado de análisis incluido en cada kit. Si no se cumple alguno de los criterios los resultados no se consideran válidos y el ensayo debe repetirse.

12. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Para obtener resultados cuantitativos parcela la densidad óptica de cada calibrador frente a la concentración del calibrador para crear una curva de calibración. La concentración de las muestras de pacientes se obtendrá por interpolación en la gráfica así obtenida. Uso de software de reducción de datos de un 4-parámetros-Fit con coordenadas lin-log de la densidad óptica y la concentración es el método de reducción de datos de la elección.

13. LOS CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO**Calibrado**

El sistema de ensayo se calibra frente al suero de referencia reconocido internacionalmente de E.N. Harris, Louisville y el material de referencia específico IRP 97/656 (IgG) y HCAL (IgG) / EY2C9 (IgM).

Rango de medición

El intervalo de cálculo de este ensayo ELISA es

IgG: 0 - 100 GPL-U/ml

IgM: 0 - 100 MPL-U/ml

Valores previstos

En un estudio habitual del intervalo con muestras de suero de donantes de sangre sanos se han establecido los siguientes intervalos con el ensayo ELISA:

Valor límite

IgG: 10 GPL-U/ml

IgM: 10 MPL-U/ml

Interpretación de los resultados

	negativa	positiva
IgG	< 10 GPL-U/ml	≥ 10 GPL-U/ml
IgM	< 10 MPL-U/ml	≥ 10 MPL-U/ml

Linealidad

Se diluyeron en serie muestras de pacientes con niveles altos de anticuerpos en un tampón de muestra para demostrar el intervalo dinámico del ensayo en el límite superior/ inferior de linealidad. Se calculó la actividad para cada dilución a partir de la curva de calibración con un 4-parámetros-Fit con el lin-log coordina.

Muestra	Dilución	Observado GPL/MPL-U/ml	Esperado GPL/MPL-U/ml	O/E [%]
IgG 1	1:100	98.0	98.4	100
.	1:200	49.6	49.2	101
.	1:400	24.3	24.6	99
.	1:800	12.0	12.3	98
.	1:1600	5.8	6.2	94
IgG 2	1:100	92.4	92.4	100
.	1:200	45.9	46.2	99
.	1:400	22.7	23.1	98
.	1:800	11.4	11.6	99
.	1:1600	5.4	5.8	94
IgM 1	1:100	92.7	92.7	100
.	1:200	45.7	46.4	99
.	1:400	22.8	23.2	98
.	1:800	11.2	11.6	97
.	1:1600	5.4	5.8	93
IgM 2	1:100	72.4	74.2	100
.	1:200	36.5	37.1	98
.	1:400	18.7	18.6	101
.	1:800	8.9	9.3	96
.	1:1600	4.4	4.6	95

Límite de detección

Sensibilidad funcional

IgG: 0.5 GPL-U/ml

IgM: 0.5 MPL-U/ml

Datos técnicos

Precisión intranalítica: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres (3) muestras a partir de los resultados de 24 análisis en una única serie. En la tabla siguiente se muestran los resultados para la precisión intranalítica. Precisión entre ensayos: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres muestras a partir de los resultados de seis (6) análisis en cinco (5) series diferentes. Los resultados para las precisiones de serie en serie se muestran en la siguiente tabla.

Intra-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.4	5.1
2	18.7	3.4
3	59.9	5.2

Inter-Assay IgG		
Sample	Mean GPL-U/ml	CV %
1	10.0	3.6
2	17.7	5.4
3	57.9	4.9

Intra-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.8	4.1
2	30.8	3.5
3	63.8	3.7

Inter-Assay IgM		
Sample	Mean MPL-U/ml	CV %
1	12.6	5.3
2	31.9	4.1
3	62.1	4.2

Interferencias

No se ha observado ninguna interferencia con sueros hemolíticos (hasta 1000 mgr./dL), lipémicos (hasta 3gr./dL triglicéridos) o ictericos (hasta 40 mgr./dL) Ni se han observado efectos de interferencia con anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato).

Resultados del estudio

Study population	n	Pos IgG	%	Pos IgM	%
Primary APS	8	7	87.5	6	75.0
Secondary APS	65	60	92.3	33	50.8
Normal human sera	150	4	2.7	5	33

Diagnostico clinico

IgG	Pos	Neg
Pos	67	4
Neg	6	146
	73	150
		223

Sensibilidad: 91.8 %
 Especificidad: 97.3 %
 Eficiencia diagnostica: 95.5 %

Diagnostico clinico

IgM	Pos	Neg
Pos	39	5
Neg	34	145
	73	150
		223

Sensibilidad: 53.4 %
 Especificidad: 96.7 %
 Eficiencia diagnostica: 82.5 %

14. LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Los rangos de referencia anteriores, deberían considerarse únicamente como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de anticuerpos en muestras de pacientes.

REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA

1. Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De F, V, Ruffatti A, Bison E et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res* 2011; 128(6):583-6.
2. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de LB, Forastiero R et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):191-205.
3. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13(1):70-6.
4. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(4):192-9.
5. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2- glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7(11):1767-73.
6. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):230.
7. Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3):447-61.
8. Fischer MJ, Rauch J, Levine JS. The antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;27(1):35-46.
9. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113(5):985-94.
10. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109 (4):704-15.
11. Hughes GR. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32(3):260-4.
12. Hughes GR. Hughes Syndrome (the antiphospholipid syndrome): ten clinical lessons. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):262-6.
13. Hughes GR. Antiphospholipid syndrome, migraine and stroke. *Lupus* 2010; 19(5):555-6.
14. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986;13(3):486-9.
15. Koike T, Bohgaki M, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3):129-33.
16. Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1):1-10.
17. Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev* 2006; 5(1):70-5.
18. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):295-306.
19. Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De CC et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(2):291-6.
20. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(4):335-9.
21. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120(1):127-33.
22. Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G et al. 'Criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20(2):182-90.
23. Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta-2- glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413(1-2):358-60.
24. Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol JID-9012268* 2002;15 Suppl 6:S20-27.
25. Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010; 19(4):432-5.
26. Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, Alessandri C, Allegri F, Bistoni O et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(2):268-74.
27. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309-11.
28. Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, Baumgart K, Bird R, Brighton TA et al. Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 2008; 40(1):58-63.
29. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36(1):63-8.

- 1** Pipet **100 µl** calibrator, control or patient sample
 → Incubate for **30 minutes** at room temperature
 → Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 2** Pipet **100 µl** enzyme conjugate
 → Incubate for **15 minutes** at room temperature
 → Discard the contents of the wells and wash 3 times with **300 µl** wash solution
- 3** Pipet **100 µl** substrate solution
 → Incubate for **15 minutes** at room temperature
- 4** Add **100 µl** stop solution
 → Leave untouched for **5 minutes**
 → Read at **450 nm**

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Francais	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore