

# AUTOSTAT™II β-2 GPI IgM β-2 Glycoprotein-I IgM

**REF** FGA23



## PROPRIETARY AND COMMON NAMES

Hycor Biomedical Autostat™II Anti-β-2 Glycoprotein-I IgM enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) specific for IgM antibodies to β-2 Glycoprotein-I (β-2 GPI).

## INTENDED USE

Enzyme-linked immunosorbent assay method for the semi-quantitative determination of specific IgM autoantibodies to β-2 GPI in human serum. The results of the anti-β-2 GPI assay can be used as an aid in the diagnosis of auto-immune diseases associated with elevated levels of anti-β-2 GPI antibodies including anti-phospholipid syndrome. Levels of these autoantibodies are one indicator in a multi-factorial diagnostic regime.

This device has been validated for use with the Hycor HYTEC automated EIA instrument. In addition, a manual assay protocol is described below.

For *in vitro* diagnostic use only.

## INTRODUCTION

Anti-phospholipid antibodies (aPL) are a group of immunoglobulins associated with binding of negatively charged phospholipids including cardiolipin and phosphatidyl serine. High serum levels of anti-phospholipid antibodies are frequently found in patients with recurrent arterial and venous thromboembolism, recurrent foetal loss and thrombocytopenia, the main features of anti-phospholipid syndrome (APS). These symptoms are also often present in cases of Systemic Lupus Erythematosus (SLE), when elevated levels of aPL are detected.

It has been reported that β2-Glycoprotein I (β2-GPI), a 50 kD plasma protein, is required for binding of anti-cardiolipin and anti-phospholipid antibodies and was more recently found to be the target for a specific group of aPL. The conformational epitope for anti-β2-GPI antibodies is thought to develop when β2-GPI interacts with a lipid membrane composed of negatively charged phospholipids or, more recently reported, when it is adsorbed to the surface of a polystyrene microtitre plate.

Antibodies targeting β2-GPI specifically have been found to be the dominant autoantibody type in anti-phospholipid positive sera and is widely accepted as a clear diagnostic indicator of APS and of SLE associated with APS.

All 3 isotypes ( IgG, IgM and IgA) have been shown to be associated with APS. IgA anti-β2GPI in particular has been correlated significantly with venous thrombosis in these diseases. Although the levels of each isotype of β2GPI antibodies can correlate significantly with the other Isotypes, it is advised that all 3 isotypes are measured to ensure maximum sensitivity.

To increase the efficiency of clinical laboratory testing for APS, anti-cardiolipin IgM and IgG, β-2-GPI IgG and IgA ELISAs are also available from Hycor Biomedical Ltd.

## PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

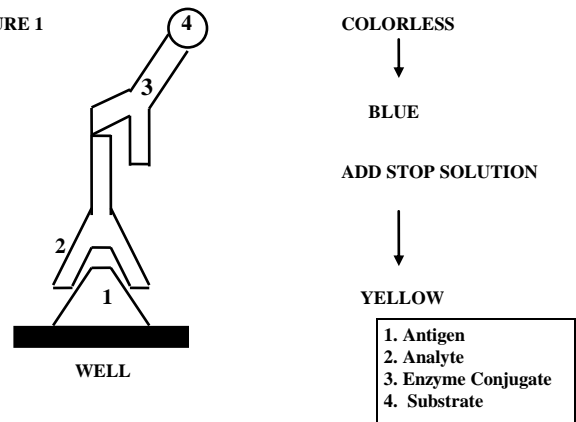
The Autostat™II assay for detection of autoantibodies is a solid phase immunosorbent assay (ELISA) in which the analyte is indicated by a colour reaction of an enzyme and substrate. The Autostat™II wells are coated with purified antigen (1).

On adding diluted serum to the wells the antibodies (2) present bind to the antigen. After incubating at room temperature and washing away unbound material, horseradish peroxidase conjugated anti-IgM monoclonal antibody (3) is added, which binds to the immobilised antibodies.

Following further incubation and washing, tetra-methyl benzidine substrate (TMB) (4) is added to each well. The presence of the antigen-antibody-conjugate complex turns the substrate to a dark blue colour. Addition of the stop solution turns the colour to yellow.

The colour intensity is proportional to the amount of autoantibodies present in the original serum sample.

FIGURE 1



## MATERIALS PROVIDED

- Sheep anti-human IgM conjugate: One vial containing 15ml of ready-to-use HRP conjugate. Conjugate diluent contains 0.05% Proclin 300. Conjugates are color coded pink.

- Microplate: One microplate is supplied which contains 12 strips of 8 breakapart wells. The wells are coated with purified β-2 GPI from human plasma.

- Standards: Four vials containing 1ml of standard. The standards are in u/ml and contain human antisera. The standards contain 0.09% sodium azide as a preservative. The concentrations allocated to the standards are

Standard 1	10 u/ml
Standard 2	25 u/ml
Standard 3	50 u/ml
Standard 4	100 u/ml

- Positive control: One vial containing 0.45 ml of concentrated positive control which contains human antisera and 0.09% sodium azide as a preservative.

- Negative control: One vial containing 0.45 ml of concentrated negative control which contains normal human serum and 0.09% sodium azide as a preservative.

- TMB substrate solution: One vial containing 15ml of ready-to-use tetra-methylbenzidine (TMB) substrate.

- Sample diluent: One bottle containing 100ml of ready-to-use sample diluent buffer. The buffer includes 0.09% Sodium azide. Sample diluent buffer is color coded blue.

- Wash buffer: One bottle containing 50ml of wash buffer concentrate. Wash buffer concentrate contains 0.06% Proclin 300.

- Stop solution: One bottle containing 20ml of 0.25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stop solution.

## WARNINGS OR PRECAUTIONS

Warning - Potentially Hazardous and Biohazardous Materials

Sera used in the preparation of the standards and controls have been tested for the presence of antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 and 2), as well as for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and HCV and found to be negative. All material is tested with FDA approved assays. Because no test method can offer complete assurance that HIV, HBsAg or other infectious agents are absent, it is recommended that human serum based products be handled with the same precautions used for patient specimens.

Dispose of reagent solutions containing sodium azide and thimerosal as preservatives according to all local, state and national regulations. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.

The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in the package insert. Do not use reagents from other manufacturers in the kits. Do not dilute or adulterate the kit reagents, unless directed by the kit protocol. Do not use the substrate solution if it has begun to turn blue. Do not use heat-inactivated serum.

Reagents contain preservatives which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth. Avoid contact of reagents or patient samples with skin or mucous membranes. If contact occurs, immediately flush with large quantities of water. Avoid splashing or creation of aerosols. Reusable glassware must be thoroughly washed and rinsed so that it is free of all detergents.

Microplate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not vary reagents and incubation temperatures above or below room temperature (18 - 25°C).

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The items listed below may not all be required if using the HYTEC assay system. However, if using the HYTEC assay system additional reagents may be required. Support reagents are available from your supplier.

1. Distilled or deionized water.
2. Wash bottle, automated or semi-automated microwell plate washing system.
3. Rack for sample dilution.
4. Micropipettes including multichannels capable of accurately delivering 5-1000µl (less than 3% cv).
5. Reagent reservoirs for multichannel pipettes.
6. One-liter graduated cylinder.
7. Disposal basins and 0.5% sodium hypochlorite (50 ml bleach in 950ml water).
8. Single or dual wavelength microplate reader with 450nm filter. If dual wavelength is used, set the reference filter to 600 - 650 nm.
9. Paper towels, pipette tips and timer

## STORAGE AND SHELF LIFE

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. **The opened kit should be used within one month.**

## INTERFERENCES AND HOOK EFFECT

Grossly haemolysed, lipaemic or microbiologically contaminated samples should not be used. Samples with abnormally elevated levels of haemoglobin, bilirubin and especially EDTA may interfere with assay performance and accuracy.

Within the limitations of the assay dynamic range, the equipment used and a dilution factor of 1/100, no hook effect was observable or of significance in this assay.

## SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use serum in this procedure. It is most important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Obtain patient samples by non-traumatic venipuncture, using a vacuum tube or sterile syringe. If a syringe is used, transfer the blood immediately to a vacuum tube (plain red-top or serum separator).

Allow samples to clot at room temperature (18-25°C) for at least 20-30 minutes, until the clot just begins to retract. Spin the sample in a centrifuge. Following the centrifugation, transfer the cell-free serum to a tightly stoppered storage tube.

Do not use sera samples showing signs of haemolysis. If it is necessary to store a sample prior to analysis, it is recommended that, for a period of up to 72 hours, store the sample in a sealed container at 2-8°C. Freeze samples at -20°C if longer storage is required. Avoid repeat freeze-thawing.

## LIMITATIONS OF USE

A negative result should not be used as a sole criterion to rule out anti-phospholipid syndrome or other autoimmune disease, but must be taken in relation to other clinical observations and diagnostic tests. While the precision of the Autostat™II kit is sufficient to allow samples to be measured in single determinations, this is done at the clinical laboratory's discretion. It is advised that duplicate determinations should be used to enable identification of potential pipetting error or to allow for confirmation in the equivocal range.

It should be noted that anti-β-2 GPI antibodies occur at low levels in other autoimmune and non-autoimmune conditions. Therefore all other clinical observations and diagnostic tests should be taken into account for clinical diagnosis.

## REAGENT PREPARATION

- Wash buffer: Measure and dilute 50 ml of the 20 X wash buffer to one liter with distilled or deionized water. Mix well before use. Store this solution at 2-8°C if it is not to be used immediately. The diluted wash buffer is stable at 2-8°C for one week.

- Positive and negative controls: These are provided in a concentrated form and should be diluted 1/100 with sample diluent buffer before use. Prepare fresh control dilutions before each assay run. Vortex all samples and controls before testing.

The conjugate, substrate and stop solution in Autostat™II kits are supplied in a ready-to-use format.

## MANUAL ASSAY PROTOCOL

1. Bring all reagents to room temperature (18-25°C).
2. Select sufficient microwells for the test. Remove protective covering and select sufficient wells to accommodate the patient samples, standards and assay controls. Each sample is recommended to be tested in duplicate.
3. Dilute all serum samples and assay controls 1/100 in sample diluent by adding 5µl to 495µl sample diluent. Standards do not require dilution.
4. Pipette 100µl of the standards, diluted control or diluted patient sample into the wells. To achieve blanking on the plate reader add a 'no serum' control of 100µl of sample diluent to the first two wells. This will act as the zero point for the curve fit.
5. Incubate the wells at room temperature (18-25°C) for 30 minutes.
6. Wash the wells three times with diluted wash buffer. This can be done manually with a multichannel pipette or on an automatic plate washer. Empty the wells, invert and tap dry on paper towel.
7. Add 100µl of ready-to-use conjugate to each well.
8. Incubate the wells at room temperature (18-25°C) for 15 minutes.
9. Repeat washing as in section 6. above.
10. Add 100µl of ready-to-use TMB substrate to each well.
11. Incubate the wells at room temperature (18-25°C) for 15 minutes.
12. Add 50µl of stop solution to each well. Tap gently to ensure uniform color distribution and read within 15 minutes.
13. To read the plate, ensure the base is free from moisture and no air bubbles are in the wells. Read the absorbance of the well contents at 450nm on a suitable plate reader. On readers equipped with a dual wavelength facility set the reference filter to 600 - 650nm.
14. Subtract the blank (or mean of blanks) from the optical densities of the standard, controls and patient samples. If the assay was performed in duplicate, the mean of the wells should be taken.

## HYTEC INSTRUMENT ASSAY PROTOCOL

Please refer to the HYTEC automated EIA system procedure manual for specific instructions on using this assay with the HYTEC automated instrument. Dilutions of controls and samples are performed automatically by the HYTEC instrument. Assay results are calculated by the HYTEC system automatically.

## CALCULATION OF RESULTS

The results of the assay may be calculated either qualitatively or quantitatively:

### Qualitative Calculation:

Only the assay blank and standard 2 should be run. Calculate the mean, blank corrected, absorbance value (OD) for duplicates of the kit standard. Calculate the mean, blank corrected, absorbance value (OD) for duplicates of the kit controls and patient samples. Using the following algorithm, calculate the concentration of each of the samples:

$$\frac{\text{Concentration of standard 2}}{\text{OD of standard 2}} \times \text{OD of sample or control}$$

The concentration of standard 2 is 25 u/ml.

This method provides a qualitative result only

### Semi-Quantitative Calculation:

An assay blank and standards 1, 2, 3 and 4 should be run. Plot the blank corrected optical densities (OD's) of the standards against the concentration values, using a linear y-axis (OD) and a logarithmic x-axis (concentration). Use the reagent blank as the zero standard. The concentration value of the patient samples can then be determined from this calibration curve.

Alternatively, use a 4-parameter logistic curve fitting for the standard curve and for calculating results, using a log scale for the x-axis and a linear scale for the y-axis.

## MANUAL TYPICAL RESULTS

The data below are for example only and should not be used for calculation of results. The results were calculated using the formula described in the 'Calculation of Results' section.

	OD	OD	mean OD	Result
Reagent Blank	0.092	0.091	0.091	
Standard 1	0.183	0.179	0.181	
Standard 2	0.435	0.458	0.447	
Standard 3	1.019	1.000	1.010	
Standard 4	2.220	2.347	2.283	
Sample 1	0.947	0.951	0.949	60.3 u/ml
Sample 2	0.655	0.656	0.655	39.6 u/ml

## INTERPRETATION OF RESULTS

A total of 160 samples were assayed. 70 of the samples were from normal subjects, 50 samples were from patients with confirmed Anti-Phospholipid Syndrome and 40 samples from patients with other autoimmune conditions. The cut-off shown below was based on testing of 70 normal samples.

u/ml	Negative	Equivocal	Positive
β-2 GPI IgM	< 12	12 - 16	> 16

## MANUAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Analytical Specificity and Sensitivity

Of a panel of 70 'normal' samples, all 70 samples gave a negative result.

A panel of 50 samples from patients clinically diagnosed with Anti-Phospholipid Syndrome were tested. 22 out of 50 samples resulted positive (44%).

Ten samples from patients with syphilis were tested, all gave a negative result.

40 samples from patients with other autoimmune conditions were tested with the following results;

DISEASE STATE	No. POSITIVE
Systemic Lupus Erythematosus (n = 20)	0
Rheumatoid Arthritis (n = 5)	0
ANCA/GBM (n = 11)	0
Thyroid Disease (n = 4)	0

The sensitivity of the assay was established by calculation of the mean plus three standard deviations of a minimum of 20 replicates of the zero standard which gave a value of 5.65 u/ml.

### Relative Specificity and Sensitivity

The assay was compared with another commercially available test using the above panel of APS samples, other disease state samples and 'normal' samples. The results are shown below:

		Autostat II		
		Positive	Negative	Equivocal
Predicate	Positive	19	1	1
Device	Negative	3	133	3

Relative sensitivity	95.0%
Relative specificity	97.8%
Overall agreement	97.4%

Equivocal results were omitted from the calculation.

### Reproducibility

Three samples across the assay range were tested in duplicate in a total of twenty assays.

Inter-assay variation	A	B	C
Mean concentration	81.3	14.5	35.7
%CV	8.1	10.4	9.9

Intra-assay variation	A	B	C
Mean concentration	81.3	14.5	35.7
Mean %CV	1.3	4.0	1.3

## AUTOMATED TYPICAL RESULTS

The data below are for example only and should not be used for calculation of results. The results were calculated using the formula described in the 'Calculation of Results' section.

	OD	OD	mean OD	Result
Reagent Blank	0.009	0.010	0.009	
Standard 1	0.137	0.141	0.139	
Standard 2	0.616	0.627	0.622	
Standard 3	1.611	1.634	1.623	
Standard 4	4.082	4.263	4.173	
Sample 1	1.029	1.003	1.016	41.1 u/ml
Sample 2	2.883	2.883	2.883	117.2 u/ml

### Reproducibility

Three samples across the assay range were tested in duplicate in a total of twenty assays.

Inter-assay variation	A	B	C
Mean concentration	21.5	57.2	31.0
%CV	11.6	7.0	6.9

Intra-assay variation	A	B	C
Mean concentration	21.5	57.2	31.0
Mean %CV	3.3	1.7	2.1

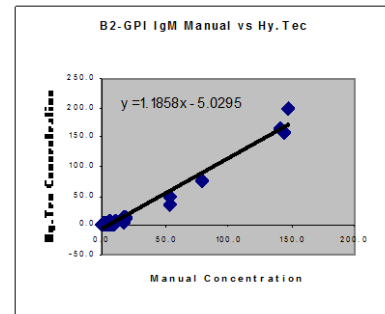
## QUALITY CONTROL

Good laboratory practice indicates that with each assay run, one or more quality control samples of known antibody level should be analyzed as though they were clinical samples. Positive and negative control samples are supplied with each kit, which may be assayed with each run. The results of these quality control samples should fall within the limits indicated on the Certificate of Analysis.

Should the results fall outwith this range repeat the assay using freshly prepared controls. Should the results continue to fall outside the specific range, and after equipment, adherence to the protocol and laboratory procedure have been verified, seek assistance from the supplier. Do not report patient results if the control results fall outwith the acceptable ranges.

### Manual and Automated Correlation.

A linear regression analysis of the correlation between the manual and automated β-2 GPI IgM assays was performed. 60 samples that were run on both systems were used. The correlation coefficient is 0.99. 95% confidence intervals for the slope and intercept are 1.134 to 1.238 and -6.913 to -3.160 respectively.



## BIBLIOGRAPHY

- Galli M et al (1990) Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 335: 1544-1547.
- Hughes GRV (1993) The Antiphospholipid Syndrome: Ten Years On. *Lancet*. 342: 341-344
- Matsuura E & Koike T (1996) Beta-2-Glycoprotein I Autoantibodies. In *Autoantibodies*. Ed Peter AB and Schoenfeld Y.
- Tsutsumi A et al (1996) Antibodies to beta-2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 39(9): 1466-74.
- Guerin J et al (1997) Antibodies to B2-Glycoprotein I; a specific marker for the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol* 109:304.
- Gomez-Pacheco L et al (1999) Serum anti-beta-2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies during thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. *Am J Med*. 106 (4): 417-23.
- Rand JH (2002) Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circulation Research*. 90: 29-37.
- Isotypes of anti-Beta2-glycoprotein I antibodies: association with thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol* 2001 Mar;28(3) 520-4



**Hycor Biomedical**  
7272 Chapman Ave  
Garden Grove  
California 92841  
U.S.A.  
+1 800 382 2527 (Tel)  
+1 714 901 1264 (Fax)  
[www.hycorbiomedical.com](http://www.hycorbiomedical.com)

**Advena Ltd.**  
Pure Offices  
Plato Close  
Warwick CV34 6WE  
U.K.  
+44(0) 1926 800153 (Tel)

## FRANÇAIS

### UTILISATION

Méthode de dosage ELISA pour la détermination quantitative des IgM spécifiques du  $\beta$ -2 GPI dans le sérum humain. Les résultats du dosage des anticorps  $\beta$ -2 GPI IgM peuvent être utilisés comme aide au diagnostic de maladies auto-immunes comprenant la syndrome anti-phospholipid. Les taux de ces auto-anticorps sont des indicateurs d'un diagnostic multi-factoriel.

Pour diagnostic *in-vitro*.

### MISES EN GARDES OU PRECAUTIONS

#### Attention - Matériel potentiellement dangereux - Matériel biologique potentiellement dangereux.

Les sérums utilisés dans la préparation des standards et des contrôles ont été testés en anticorps anti-virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et VIH-2), en antigène HBs (antigène de surface de l'hépatite B) et en anticorps anti-VHC et ont été trouvés négatifs. Tous les matériels ont été testés par des tests approuvés par la FDA. Puisqu'aucune méthode connue n'offre l'assurance complète que les virus VIH, VHB, VHC ou tout autre agent infectieux est absent, il est recommandé que les produits à base de sérums humains soient manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour les échantillons cliniques.

Éliminer les solutions de réactifs contenant de l'azide de sodium et du thimerosal comme agents conservateurs en respectant les réglementations en vigueur. Lors de l'élimination des produits contenant de l'azide de sodium, laver à grande eau. Les éliminer avec précautions car l'azide de sodium peut former des composés explosifs au contact prolongé avec le plomb ou le cuivre des canalisations.

Les données de performance présentées ont été obtenues en utilisant des réactifs spécifiques cités dans le mode d'emploi. Ne pas utiliser de réactifs provenant de coffrets d'autres fabricants. Ne pas diluer ou modifier les réactifs du coffret, sauf si décrit dans le protocole. Ne pas utiliser la solution substrat si la coloration a commencé à virer au bleu. Ce produit doit être utilisé uniquement pour diagnostic *in-vitro*. Ne pas utiliser de sérum inactivé par la chaleur.

Les réactifs contiennent des agents conservateurs qui peuvent être toxiques s'ils sont ingérés. Ne pas pipetter à la bouche. Éviter le contact des réactifs ou des échantillons cliniques avec la peau ou les muqueuses. S'il y a contact, laver immédiatement à grande eau. Éviter les projections ou l'apparition d'aérosols.

Le matériel en verre réutilisable doit être soigneusement lavé et rincé afin d'être exempt de tout détergent.

Le lavage des microplaques est important. Des micropuits mal lavés donneront des résultats erronés. Ne pas laisser les micropuits sécher entre les incubations. Ne pas faire varier les réactifs et les températures d'incubation au-dessus ou au-dessous de la température ambiante (18-25°C).

### LIMITES D'UTILISATION

Un résultat négatif ne doit pas être utilisé comme seul critère pour écarter une maladie auto-immune, mais doit être considéré avec les autres observations cliniques et autres résultats de tests biologiques. Bien que la précision du coffret soit suffisante pour tester en un seul exemplaire les échantillons, la décision en est laissée à chaque laboratoire. Pour permettre d'identifier une erreur potentielle de pipetage ou confirmer une valeur équivoque, faire le dosage en double exemplaire.

Il faut noter que les anticorps auto-immunes sont présents à des taux faibles dans d'autres pathologies auto-immunes. De ce fait, toutes les observations cliniques ainsi que les autres dosages biologiques doivent être pris en compte pour porter un diagnostic clinique.

### PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum. Les échantillons doivent conserver leur intégrité chimique du recueil jusqu'au dosage et être fraîchement collectés selon les procédures standards suivantes : Prélever par ponction veineuse franche, à l'aide d'un vacutainer ou d'une seringue stérile. Si la seringue est utilisée, transférer le sang immédiatement dans un vacutainer (bouchon rouge ou séparateur de sérum).

### PREPARATION DES REACTIFS

- Tampon de lavage : mesurer et ajouter 50 ml de tampon de lavage concentré 20x à 1 litre d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger avant utilisation. Conserver cette solution à 2-8°C si elle n'est pas utilisée immédiatement. Le tampon de lavage dilué est stable 1 semaine à 2-8°C.

2- Contrôles positif et négatif : ces contrôles sont fournis sous forme concentrée et doivent être dilués au 1/100 avec le tampon diluant échantillon avant utilisation. Préparer des dilutions fraîches des contrôles avant chaque série de dosages. Agiter au Vortex tous les échantillons et les contrôles avant de les tester.

### CONSERVATION ET DATE DE PEREMPTION

Les composants du coffret Autostat™II doivent être conservés entre 2° et 8°C et ne pas être utilisés après la date de péremption figurant sur le coffret. Avant utilisation, tous les composants de la trousse doivent être ramenés à température ambiante (18° - 25°C). Après ouverture, les coffrets doivent être utilisés dans les trois mois qui suivent.

### PROTOCOLE DE DOSAGE MANUEL

1. Amener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C).
2. Sortir un nombre suffisant de micropuits pour le test. Enlever la protection et prendre un nombre suffisant de micropuits pour tester les échantillons cliniques, les standards et les contrôles. Il est recommandé de doser en double exemplaire chaque échantillon.
3. Diluer tous les échantillons sériques et les contrôles au 1/100 avec le tampon diluant échantillon en ajoutant 5  $\mu$ l à 495  $\mu$ l de diluant échantillon. Les standards ne doivent pas être dilués.
4. Distribuer 100  $\mu$ l de standards, de contrôles dilués ou d'échantillons cliniques dilués dans les micropuits. Pour avoir un blanc pour le lecteur de microplaque, ajouter 100  $\mu$ l de contrôle "sans sérum", diluant échantillon dans les deux premiers puits. Ils serviront de point zéro pour la courbe d'étalonnage.
5. Incuber les micropuits à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes.
6. Laver trois fois les micropuits avec du tampon de lavage dilué. Ceci peut être réalisé manuellement avec une multipipette ou avec un laveur automatique de microplaque. Vider les micropuits, retourner la microplaque et la taper sur une serviette en papier.
7. Ajouter 100  $\mu$ l de conjugué prêt à l'emploi dans chaque puits.
8. Incuber les puits à température ambiante (18-25°C) 15 minutes.
9. Recommencer le lavage comme décrit dans la section 6 ci-dessus.
10. Ajouter 100  $\mu$ l de substrat TMB prêt à l'emploi dans chaque puits.
11. Incuber les puits à température ambiante (18-25°C) 15 minutes.
12. Ajouter 50  $\mu$ l de solution d'arrêt dans chaque puits. Tapoter doucement pour uniformiser la coloration et lire dans les 15 minutes.
13. Pour lire la plaque, s'assurer qu'il n'y a pas d'humidité sur le fond et qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits, lire l'absorbance du contenu des puits à 450 nm sur un lecteur de plaques. Sur les lecteurs équipés d'une double longueur d'onde, positionner le filtre de référence à 600-650 nm.
14. Soustraire la valeur du blanc (ou de la moyenne des blancs) des densités optiques du standard, des contrôles et des échantillons cliniques. Si le dosage est réalisé en double exemplaire, prendre la moyenne des valeurs obtenues pour les deux puits.

### PROTOCOLE DE DOSAGE SUR AUTOMATE

Se référer aux manuels d'utilisation des différents fabricants.

### CALCUL DES RESULTATS

#### Calibration qualitative.

Calculer la valeur moyenne de l'absorbance (DO) corrigée par le blanc pour le dosage en double exemplaire du standard du coffret. Calculer l'absorbance (DO) moyenne corrigée par le blanc pour les dosages en double exemplaire des contrôles du coffret et des échantillons cliniques. À l'aide de l'algorithme suivant, calculer la concentration de chaque échantillon :

$$\frac{\text{Concentration standard 2} \times \text{DO échantillon ou contrôle}}{\text{DO standard 2}}$$

La concentration du standard 2 est 25 u/ml.

#### Calibration quantitative.

Reporter les densités optiques (DO) corrigées par le blanc des standards sur l'axe des y (linéaire) et les valeurs des concentrations sur l'axe des x (logarithmique) sur un papier semi-logarithmique. Utiliser le blanc réactif comme standard zéro. La valeur de la concentration de chaque échantillon clinique peut être déterminée à partir de cette courbe de calibration.

Alternativement, utiliser une courbe à quatre paramètres pour la courbe de calibration et pour le calcul des résultats, en utilisant une échelle logarithmique pour l'axe des x et une échelle linéaire pour l'axe des y.

### INTERPRETATION DES RESULTATS

Le seuil de dosage a été déterminé en groupant les données obtenues sur un panel de 78 échantillons cliniques provenant de patients normaux asymptomatiques et un panel d'échantillons positifs de maladie auto-immune. Les résultats sont les suivants :

u/ml	Négatif	Equivoque	Positif
$\beta$ -2 GPI IgM	< 12	12 - 16	> 16

### INFORMATION SUPPLEMENTAIRE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent qu'à chaque manipulation, un ou plusieurs échantillons de contrôle de qualité dont le taux d'anticorps est connu, soient analysés comme des échantillons cliniques.

Deux contrôles sont fournis dans le coffret pour être testés à chaque nouvelle série. Les valeurs obtenues doivent rester dans les limites indiquées sur le certificat d'analyse. Si les résultats 'sortent' de ces limites (variables d'un lot à l'autre), la série doit être recommencée en utilisant de nouveaux contrôles préparés extemporanément. Si les résultats demeurent non valides, après vérification de l'équipement du laboratoire et du suivi correct du mode opératoire, il est recommandé de contacter le fournisseur.

## DEUTSCH

### ANWENDUNGSGEBIET

ELISA-Methode (Enzyme-linked immunosorbent assay) zur quantitativen Bestimmung von spezifischen IgM im Humanserum. Die Ergebnisse des  $\beta$ -2 GPI IgM Tests können als Hilfsmittel bei der Diagnose von Autoimmunkrankheiten, wie u.a. der Anti-Phospholipid Syndrom, eingesetzt werden. Die Konzentration dieser Autoantikörper ist einer der Indikatoren in einem mehrfaktoriellen Diagnoseschema.

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test kann mit dem automatischen EIA-Gerät HYCOR HYTEC eingesetzt werden. Außerdem ist weiter unten ein manuelles Testprotokoll beschrieben.

### WARNHINWEISE ODER VORSICHTSMASSNAHMEN

Warnhinweis - Potentiell gefährliche und biologisch gefährliche Materialien.

Für diesen Test wird Serum benötigt.

Die bei der Zubereitung der Standards und Kontrollen verwendeten Seren wurden auf Antikörper gegen das Human-Immunodeficiency-Virus (HIV 1 und 2) sowie auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und auf HCV getestet und als negativ nachgewiesen. Alle Materialien wurden mit von der FDA zugelassenen Tests analysiert.

Da keine Nachweismethode die Anwesenheit von HIV, HBsAg oder anderen infektiösen Stoffen mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, wird empfohlen, Produkte auf der Grundlage von Humanserum anhand der gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie Patientenproben zu handhaben.

Die Entsorgung von Reagenzlösungen, die Natriumazid und Thimerol als Konservierungsmittel enthalten, muß gemäß allen örtlichen, Landes- und Bundesvorschriften erfolgen. Zur Entsorgung von natriumazidhaltigen Reagenzien die Reagenzien mit reichlich Wasser wegsülen. Dabei sorgfältig vorgehen, da Natriumazid bei längerem Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren explosive Gemische bilden kann.

Die hier angegebenen Leistungsdaten wurden unter Verwendung der in der Packungsbeilage aufgeführten spezifischen Reagenzien erzielt. Keine Reagenzien anderer Hersteller mit den Reagenzpackungen (Kits) verwenden. Die Reagenzien in dieser Packung nicht verdünnen oder verfälschen, wenn dies nicht ausdrücklich im Protokoll für das Kit so angegeben ist. Die Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden, wenn sie anfängt, blau zu werden. Dieses Produkt darf lediglich als In-vitro-Diagnostikum verwendet werden.

Kein hitze-inaktiviertes Serum verwenden.

Die Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, die bei Verschlucken eine toxische Wirkung haben können. Nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt von Reagenzien oder Patientenproben mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt unverzüglich mit reichlich Wasser abspülen. Spritzer oder Aerosolbildung vermeiden. Wiederverwendbare Glasbehälter müssen gründlich gewaschen und abgespült werden, um alle Detergensreste zu entfernen.

Das Waschen der Mikroplatte ist wichtig. Nicht richtig ausgewaschene Vertiefungen führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Vertiefungen zwischen den einzelnen Inkubationen nicht trocknen lassen. Reagenz- und Inkubationstemperaturen nicht über oder unter Raumtemperatur (18 - 25°C) steigen bzw. fallen lassen.

### VERFAHRENSGRENZEN

Ein negatives Ergebnis sollte nicht als alleiniges Kriterium zum Ausschluß einer Autoimmunkrankheit verwendet werden, sondern muß stets im Zusammenhang mit anderen klinischen Beobachtungsdaten und Diagnosetests betrachtet werden. Die Präzision des Autostat<sup>TM</sup>II-Kits ist zwar hoch genug, daß Proben im Einzelnachweis bestimmt werden können, aber dies liegt im Ermessen des jeweiligen klinischen Labors. Es wird empfohlen, zur Feststellung von potentiellen Pipettierfehlern oder zur Bestätigung im zweideutigen Bereich jeweils eine doppelte Bestimmung durchzuführen. Hinweis: Antikörper kommen in geringen Konzentrationen auch bei anderen Autoimmunkrankheiten und Nicht-Autoimmunkrankheiten vor. Daher sind bei der klinischen Diagnose alle anderen klinischen Beobachtungen und Diagnosetests zu berücksichtigen.

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Waschpuffer: 50 ml des 20-X-Waschpuffers abmessen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf einen Liter verdünnen. Vor Gebrauch gut mischen. Diese Lösung bei 2 - 8°C lagern, wenn sie nicht sofort verbraucht wird. Der verdünnte Waschpuffer bleibt bei 2 - 8°C eine Woche lang stabil.  
- Positive und negative Kontrollen: Diese werden in konzentrierter Form geliefert und sollten vor Gebrauch im Verhältnis 1/100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden. Vor jeder Meßreihe frische Kontrollverdünnungslösung zubereiten. Vor der Analyse alle Proben und Kontrollen aufwirbeln. Konjugat, Substrat und Stopplösung im Autostat<sup>TM</sup>II-Kit werden gebrauchsfertig geliefert.

### LAGERUNG UND AUFBEWAHRUNGSDAUER

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2 - 8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2 - 8°C gelagert werden. Das angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden.

## MANUELLES TESTPROTOKOLL

1. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25°C) kommen lassen.
2. Eine Mikroplatte mit ausreichend Vertiefungen für den Test aussuchen. Schutzabdeckung entfernen und genug Vertiefungen wählen, um die Patientenproben, Standards und Testkontrollen aufzunehmen. Es wird empfohlen, jede Probe doppelt zu analysieren.
3. Alle Serumproben und Testkontrollen im Verhältnis 1/100 in Probenverdünnungslösung verdünnen; dazu 5 µl bis 495 µl Probenverdünnungslösung zugeben. Bei Standards ist keine Verdünnung erforderlich.
4. 100 µl der Standards, verdünnten Kontrolle bzw. verdünnten Patientenprobe in die Vertiefungen geben. Um eine Leerprobe für den Plattenleser zu ermöglichen, eine Kontrolle mit 100 µl Probenverdünnungslösung ohne Serum in die ersten zwei Vertiefungen geben. Dies dient als Nullpunkt für die Erstellung der Kurve.
5. Die Vertiefungen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen.
6. Die Vertiefungen dreimal mit verdünntem Waschpuffer waschen. Dieser Schritt kann entweder mittels einer Mehrkanalpipette oder mit einem automatischen Plattenwaschgerät erfolgen. Die Vertiefungen leeren, umdrehen und auf Papierhandtüchern leerklopfen.
7. 100 µl gebrauchsfertiges Konjugat in jede Vertiefung zugeben.
8. Die Vertiefungen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Den Waschschritt (siehe Punkt 6) wiederholen.
10. 100 µl gebrauchsfertiges TMB-Substrat in jede Vertiefung zugeben.
11. Die Vertiefungen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
12. 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung zugeben. Vorsichtig an die Platte klopfen, um eine gleichmäßige Farbverteilung sicherzustellen, und innerhalb von 15 Minuten ablesen.
13. Zum Ablesen der Meßwerte sicherstellen, daß die Unterseite von Feuchtigkeit frei ist und sich keine Luftblasen in den Vertiefungen befinden. Die Absorption des Inhalts der Vertiefungen bei 450 nm auf einem geeigneten Plattenlesegerät messen. Bei Lesegeräten, die mit doppelter Wellenlängenfunktion ausgestattet sind, den Referenzfilter auf 600 - 650 nm einstellen.
14. Den Wert für die Leerprobe (bzw. Mittelwert der Leerproben) von der optischen Dichte des Standards, der Kontrollen und Patientenproben subtrahieren. Bei doppelter Ausführung der Messung ist der Mittelwert der Vertiefungen zu bilden.

### TESTPROTOKOLL FÜR DAS HYTEC GERÄT

Spezifische Anweisungen zur Verwendung dieses Tests mit dem automatischen HYTEC Gerät finden Sie im Verfahrenshandbuch für das automatische HYTEC EIA-System. Die Verdünnung der Kontrollen und Proben wird vom HYTEC Gerät automatisch durchgeführt. Die Testergebnisse werden vom HYTEC System automatisch berechnet.

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

#### Qualitative Berechnung:

Berechnen Sie den mittleren, leertwertkorrigierten Absorptionswert (OD) für Duplikate des Kitstandards. Berechnen Sie den mittleren, leertwertkorrigierten Absorptionswert (OD) für Duplikate der Kitkontrollen und Patientenproben. Berechnen Sie dann anhand des folgenden Algorithmus die Konzentration jeder Probe:

$$\text{Konzentration von Standard 2} = \frac{\text{OD der Probe oder Kontrolle}}{\text{OD von Standard 2}}$$

Die Konzentration von Standard 2 beträgt 25 u/ml.

Mit dieser Methode läßt sich nur ein qualitatives Ergebnis berechnen.

#### Quantitative Berechnung:

Stellen Sie die leertwertkorrigierten optischen Dichten (OD-Werte) der Standards gegenüber den Konzentrationswerten in einer Kurve dar, und zwar unter Verwendung einer linearen Y-Achse (OD) und einer logarithmischen X-Achse (Konzentration). Verwenden Sie dabei die Reagenzleerprobe als Nullstandard. Der Konzentrationswert der Patientenproben läßt sich dann aus dieser Kalibrationskurve ermitteln. Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine logistische Kurvenanpassung mit 4 Parametern für die Standardkurve und zur Berechnung von Ergebnissen zu verwenden, und zwar anhand einer Log-Skala für die X-Achse und einer linearen Skala für die Y-Achse.

#### Interpretation der Ergebnisse.

u/ml	Negative	Mehrdeutig	Positive
$\beta$ -2 GPI IgM	< 12	12 - 16	> 16

### ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

Zur guten Laborpraxis gehört es, mit jedem Test ein oder zwei Qualitäts-Kontrollen mit einem bereits bekannten Antikörperviveau zu analysieren. Dabei sind diese wie klinische Proben zu handhaben. Hycor liefert mit jedem Kit positive und negative Kontrollseren, die in jedem Test eingesetzt werden können. Die Ergebnisse dieser Qualitäts-Kontrollen sollten sich im Rahmen der in der Qualitätsanalyse angegebenen Grenzen befinden.

Falls die Ergebnisse außerhalb dieses Bereichs liegen, sollte der Test mit frisch vorbereiteten Kontrollen wiederholt werden. Sollten die Ergebnisse, nachdem die Geräte, das Befolgen des Protokolls und das Vorgehen im Labor überprüft wurde, weiterhin außerhalb des spezifischen Bereichs liegen, wenden Sie sich bitte an den Lieferanten.

**INDICAZIONI**

Test Immunoenzimatico per la determinazione quantitativa per la determinazione di la β-2 GPI IgM, nel siero umano. Gli B2 GPI IgM si ritrovano frequentemente nei pazienti affetti da sindrome degli anti-fosfolipidi.

Per uso diagnostico *in vitro*.

**PRECAUZIONI**

I sieri usati per i controlli di questo kit sono risultati negativi all'analisi per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) e per il virus HIV con tecnica RIA. Tuttavia è consigliabile manipolarli come se si trattasse di materiale potenzialmente infetto.

E' molto importante non scambiare tra loro i componenti di lotti diversi. Tempi di incubazione diversi da quelli indicati nella procedura possono dare risultati errati. Una contaminazione batterica grave del campione o reagenti può dare falsi risultati.

Portate tutti i reagenti, pozzetti e campione a temperatura ambiente (18 - 25°C) prima dell'uso.

Utilizzare guanti di lattice monouso per manipolare campione e reagenti e lavare accuratamente le mani alla fine.

Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto della pelle e delle mucose con i reagenti ed i campione. In caso di contatto, lavare con un sapone germicida e sciacquare molto abbondantemente.

**LIMITI DI UTILIZZO**

Un risultato negativo non deve essere utilizzato come criterio unico per l'esclusione di malattie autoimmuni, ma deve essere messo in relazione con altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

Bisogna tenere presente che gli anticorpi possono essere presenti a bassi livelli in altri disturbi autoimmuni. Pertanto devono essere presi in considerazione tutti gli aspetti clinici e test diagnostici per formulare la diagnosi.

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

Il kit richiede l'utilizzo di siero. È importante conservare l'integrità chimica del campione dal momento del prelievo fino all'esecuzione del test. Eseguire il prelievo usando una tecnica non traumatica.

**PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso tranne i seguenti:

Soluzione di lavaggio concentrata: Diluire l'intero contenuto della fiala di tampone di lavaggio concentrato con acqua distillata fino ad ottenere un volume finale di 1000 ml. Nel caso non venga usata subito conservare questa soluzione a 2-8°C. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a 2-8°C.

Controlli positivo e negativo: Sono forniti e devono essere trattati come campione e diluiti 1/100 con diluente di campione prima dell'analisi.

**CONSERVAZIONE E DURATA**

I componenti del kit devono essere conservati a 2 - 8°C e non devono essere utilizzati dopo la scadenza indicata sull'etichetta della confezione. E' necessario portare tutti i componenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

**PROCEDURA MANUALE**

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
2. Stabilire un numero sufficiente di pozzetti, togliere la protezione e preparare i sieri, i calibratori e i controlli che devono essere testati.
3. Diluire tutti i campioni di siero e i controlli 1/100 con diluente campioni (5 µl di campione in 495 µl di diluente). Non è necessario diluire i calibratori.
4. Pipettare 100µl di ciascuno dei calibratori (oppure solamente del calibratore 2 se si usa il metodo singolo punto), dei controlli ed dei campioni diluiti nei relativi pozzetti. Per ottenere il bianco sul lettore ELISA si devono aggiungere 100 µl di diluente del campione nei primi 2 pozzetti. Questo è anche da considerarsi lo standard 0.
5. Incubare i pozzetti a temperatura ambiente (18-25°C) per 30 minuti.
6. Lavare i pozzetti 3 volte con la soluzione di lavaggio diluita. Questa operazione può essere eseguita manualmente usando una pipetta multicanale oppure usando un sistema automatico di lavaggio. Dopo i 3 cicli di lavaggio rovesciare i pozzetti sopra un foglio assorbente e dare un colpo per eliminare l'eccesso di liquido.
7. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di coniugato pronto per l'uso.
8. Incubare i pozzetti a temperatura ambiente (18-25°C) per 15 minuti.

9. Ripetere il lavaggio come al punto 6.
10. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di soluzione di substrato pronta per l'uso.
11. Incubare i pozzetti a temperatura ambiente (18-25°C) per 15 minuti.
12. Aggiungere 50 µl di soluzione di arresto a ciascun pozzetto. Dare un colpo leggero per favorire la distribuzione uniforme del colore a leggere entro 15 minuti.
13. Per la lettura, verificare che la base sia priva di umidità e che non vi siano bolle d'aria nei pozzetti. Leggere il valore di assorbenza a 450 nm mediante un lettore colorimetrico.
14. Sottrarre il valore di D.O. del bianco (o valore medio) dai calibratori, controlli e campioni.

Se la determinazione è stata effettuata in duplicato si considera la media dei due risultati.

**PROCEDURA SISTEMA 'HYTEC'.**

Per utilizzo il kit in sistema automatica consultare la procedura.

**DETERMINAZIONE DEI RISULTATI.**

I risultati ottenuti dalla prova con il test possono essere determinati con uno dei due metodi riportati di seguito ed ogni laboratorio può adottare il metodo più compatibile con le proprie esigenze.

**CURVA DI CALIBRAZIONE A 5 PUNTI - Quantitativa.**

Segnare le densità ottiche corrette ( dopo aver tolto il bianco) degli standard a fronte del valore in concentrazione, utilizzando un'asse lineare Y (OD) ed un'asse X logaritmica (concentrazione) il valore di concentrazione dei campioni dei pazienti può essere determinato da questa curva di calibrazione. In alternativa, se è disponibile un software per la determinazione della curva, i data possono essere elaborati utilizzando la curva 4 parametri lin-log.

**SINGOLO PUNTO - Qualitativa.**

Può essere utilizzata la seguente formula (dopo aver sottratto il valore in D. O. del bianco):

$$\frac{OD \text{ Campione}}{OD \text{ calibratore 2}} \times Conc \text{ calibratore 2}$$

Calibratore 2 = 25 u/ml.

**VALORI ATTESI.**

u/ml	Negativo	Dubbio	Positivo
β-2 GPI IgM	< 12	12 - 16	> 16

**CONTROLLO QUALITA'.**

La buona prassi di laboratorio prevede che per ogni seduta di prove, uno o più campioni di qualità controllata con livello di anticorpi noto, sia trattato come fosse un campione clinico. Nel kit sono forniti 2 controlli (positivo e negativo) che possono essere testati nel corso di ciascuna seduta. Il risultato di questi controlli deve rientrare nei limiti indicati sull'etichetta. Se i risultati dovessero essere al di fuori dei valori indicati, allora la prova dovrà essere ripetuta utilizzando propri sieri freschi a valore noto.

**PARA LO QUE SE EMPLEA.**

Método de análisis inmunosorbente de enlace enzimático para la determinación cuantitativa de la  $\beta$ -2 GPI IgM en el suero humano. Se pueden usar los resultados del análisis  $\beta$ -2 GPI IgM como ayuda en el diagnóstico de enfermedades del sistema autoinmune, incluyendo la síndrome de anti-phospholipid. Los niveles de estos anticuerpos son sólo una indicación dentro de un régimen diagnóstico multifactorial.

Este instrumento puede usarse con el equipo EIA automatizado HYCOR HYTEC. Además, se describe a continuación un protocolo de análisis manual.

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*.

**ADVERTENCIAS O PRECAUCIONES**

Aviso – Materiales potencialmente peligrosos y peligrosos biológicamente

Los sueros usados para preparar los calibradores y controles se han analizado para determinar la presencia de anticuerpos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH 1 y 2), además del antígeno superficial de la hepatitis B (HbsAg) y HCV y la respuesta fue negativa. Todos los materiales se analizan mediante ensayos aprobados por la FDA.

Ya que ningún método de prueba puede ofrecer seguridad absoluta de que no contiene VIH, HbsAg u otro agente infeccioso, se recomienda que los productos que contienen suero se manejen usando las mismas precauciones que las usadas con muestras del paciente.

Deseche los reactivos que contengan azida de sodio y timerosal como conservadores, siguiendo los reglamentos locales, estatales y nacionales. Para deshacerse de los reactivos que contienen azida de sodio, echar al desagüe y lavar con agua abundante. Desechar con precaución ya que la azida de sodio puede formar compuestos explosivos si entra en contacto prolongado con tuberías de plomo o cobre.

Los datos de actuación aquí representados se obtuvieron usando los reactivos específicos enumerados en el inserto del envase. No use reactivos de otros fabricantes en el equipo. No diluya o adultere los reactivos del equipo, a menos que el protocolo del equipo así lo indique. No use la solución sustrato si ha empezado a ponerse azul.

No use suero inactivado térmicamente.

Los reactivos contienen conservadores que podrían ser tóxicos si se ingieren. No pipeteo con la boca. Evite el contacto de los reactivos o muestras del paciente con la piel o membranas mucosas. Si ocurre el contacto, lávese inmediatamente con agua abundante. Evite salpicar o formar aerosoles. Deberá lavarse y enjuagarse bien todo el material de vidrio reusable, para que no contenga detergentes.

Es importante el lavado de las microplacas. Las celdas mal lavadas darán resultados erróneos. No deje que las celdas se sequen entre incubaciones. No varíe los reactivos y temperaturas de incubación por encima o debajo de la temperatura ambiente (18-25°C).

**LIMITACIONES DE EMPLEO**

No deberá usarse un resultado negativo como el único criterio para eliminar una enfermedad del sistema autoinmune, sino que deberá usarse en relación con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas. Aunque la precisión del equipo Autostat™II es suficiente para que se puedan medir muestras con una sola determinación, esto se hace a discreción del laboratorio clínico. Se aconseja usar determinaciones por duplicado para identificar los errores potenciales al pipetear y permitir la confirmación entre los límites equívocos.

Tómese en cuenta que los anticuerpos ocurren a niveles muy bajos en otras condiciones autoinmunes y no autoinmunes. Por lo tanto, todas las demás observaciones clínicas y pruebas diagnósticas deberán considerarse para hacer el diagnóstico clínico.

**OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS**

En este procedimiento deberá usar suero. Es fundamental conservar la integridad química de una muestra de sangre desde el momento en que se obtiene hasta que se analiza. Obtenga las muestras del paciente mediante venipunción no traumática, usando un tubo de vacío o jeringa estéril. Si se usa una jeringa, transfiera inmediatamente la sangre a un tubo de vacío (con tapón rojo simple o separador de suero).

Deje que las muestras se coagulen a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 20-30 minutos, justo hasta que el coágulo empiece a retraerse. Centrifugue la muestra. Después de la centrifugación, transfiera el suero sin células a un tubo de almacenamiento cerrado herméticamente.

**PREPARACION DE REACTIVOS**

- Lavar el tampón: Medir y diluir 50 ml del tampón de lavado 20 X a un litro con agua destilada o desionizada. Mezclar bien antes de usarse. Si no se va a usar inmediatamente, conservar esta solución a 2-8°C. El tampón de lavado diluido es estable a 2-8°C durante una semana.

- Controles positivos y negativos: Estos vienen concentrados y deberán diluirse a 1/100 con el tampón diluyente de la muestra antes de usarse. Preparar nuevas diluciones de control antes de cada serie de análisis. Antes de analizar, vorticar todas las muestras y controles.

El conjugado, sustrato y solución de paro en los equipos Autostat™II vienen listas para usarse.

**ALMACENAMIENTO Y PERIODO DE VALIDEZ**

Conservar los componentes del equipo a 2-8°C y no se usen después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta de la caja exterior. Antes de usarse, deberá dejarse que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente (18-25°C). Después de usarse, deberá volverse a sellar la placa, ponerse las tapas de las botellas y apretarse bien, el equipo deberá entonces conservarse a 2-8°C. Una vez abierto el equipo deberá usarse en menos de tres meses.

**PROTOCOLO DEL ANALISIS MANUAL**

1. Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (18-25°C).
2. Seleccionar suficientes microceldas para la prueba. Quitar la cubierta protectora y seleccionar suficientes celdas para acomodar las muestras del paciente, calibradores y controles del análisis. Se recomienda analizar por duplicado cada prueba.
3. Diluir todas las muestras de suero y controles del análisis a 1/100 en diluyente de la muestra, añadiendo 5µl a 495 µl del diluyente de la muestra. Los calibradores no tienen que diluirse.
4. Pipetear 100 µl de los calibradores, control diluido o muestra diluida del paciente y poner en las celdas. Para que el lector de placas se ponga en blanco, añadir un control "sin suero" de 100 µl de la muestra diluida a las primeras dos celdas. Este actuará como el punto cero para la curva.
5. Incubar las celdas a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos.
6. Lavar las celdas tres veces con tampón de lavado diluido. Esto puede hacerse manualmente con una pipeta de varios canales o un lavador automático de placas. Vaciar las celdas, invertir y secar con toallas de papel.
7. Añadir 100µl de conjugado listo para usarse a cada celda.
8. Incubar las celdas a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos.
9. Repetir los lavados como en la sección 6.
10. Añadir 100µl de sustrato TMB listo para usarse a cada celda.
11. Incubar las celdas a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos.
12. Añadir 50 µl de solución de paro a cada celda. Golpear ligeramente para asegurar una distribución uniforme del color y leer a los 15 minutos.
13. Para leer la placa, asegúrese de que la base no está húmeda y que no hay burbujas de aire en las celdas. Leer la absorbancia del contenido de las celdas a 450 nm en un lector de placas adecuado. En lectores equipados con una función de longitud de onda doble, poner el filtro de referencia en 600-650 nm.
14. Substraer el blanco (o promedio de blancos) de las densidades ópticas de los calibradores, controles y muestras del paciente. Si el análisis se realizó por duplicado, deberá tomarse el promedio de las celdas.

**PROTOCOLO DEL ANALISIS PARA EL INSTRUMENTO HYTEC**

En el manual de procedimientos del sistema EIA automatizado HYTEC se dan instrucciones específicas sobre el uso de este análisis con el instrumento automatizado HYTEC. Este instrumento hace automáticamente las diluciones de los controles y muestras.

El sistema HYTEC calcula automáticamente los resultados del análisis.

### CALCULO DE LOS RESULTADOS

Los resultados del análisis pueden calcularse cualitativa o cuantitativamente:

#### Cálculo cualitativo:

Calcular la media, blanco corregido, absorbancia (DO) para duplicados del calibradores del equipo. Calcular la media, blanco corregido, absorbancia (DO) para duplicados de los controles del equipo y muestras del paciente. Calcular las concentraciones de cada una de las muestras usando el siguiente algoritmo:

$$\frac{\text{Concentración del calibradores 2}}{\text{DO de la muestra o control}} \times \text{DO de los calibradores 2}$$

La concentración del calibradores 2 es 25 u/ml.

Este método sólo da un resultado cualitativo.

#### Cálculo cuantitativo:

Grficar las densidades ópticas (DO) corregidas con el blanco de los calibradores contra los valores de concentración, usando un eje de las ordenadas (y) linear (DO) y un eje de las abscisas (x) logarítmico (concentración). Usar un blanco de reactivo como el calibradores de cero. El valor de la concentración de las muestras del paciente puede determinarse a partir de esta curva de calibración.

Alternativamente, use un ajuste logístico de la curva de 4 parámetros para la curva calibradores y para calcular los resultados, usando una escala logarítmica en las abscisas y una escala linear en las ordenadas.

### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

u/ml	Negativo	Equívoco	Positivo
β-2 GPI IgM	< 12	12 - 16	> 16

### CONTROL DE CALIDAD

La buena práctica de laboratorio indica que con cada serie de análisis, deberán analizarse una o más muestras de control de calidad con un nivel conocido de anticuerpos, como si fuesen muestras clínicas. Cada equipo contiene muestras de control positivas y negativas, las que pueden analizarse con cada serie. Los resultados de estas muestras de control de calidad deberán caer dentro de los límites indicados en el Certificado de Análisis.

Si los resultados cayesen fuera de estos límites, repetir el análisis usando controles recién preparados. Si los resultados continúan cayendo fuera de los límites especificados, y después de verificar el equipo, obediencia del protocolo y procedimiento de análisis, pida ayuda al proveedor. No presente los resultados del paciente si los resultados de los controles caen fuera de los límites aceptables.

### BIBLIOGRAPHY

- Galli M et al (1990) Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 335: 1544-1547.
- Hughes GRV (1993) The Antiphospholipid Syndrome: Ten Years On. *Lancet*. 342: 341-344
- Matsuura E & Koike T (1996) Beta-2-Glycoprotein I Autoantibodies. In *Autoantibodies*. Ed Peter AB and Schoenfeld Y.
- Tsutsumi A et al (1996) Antibodies to beta-2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 39(9): 1466-74.
- Guerin J et al (1997) Antibodies to B2-Glycoprotein I; a specific marker for the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol* 109:304.
- Gomez-Pacheco L et al (1999) Serum anti-beta-2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies during thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. *Am J Med*. 106 (4): 417-23.
- Rand JH (2002) Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circulation Research*. 90: 29-37.
- Isotypes of anti-Beta2-glycoprotein I antibodies: association with thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol* 2001 Mar;28(3) 520-4



**Hycor Biomedical**  
7272 Chapman Ave  
Garden Grove  
California 92841  
U.S.A.  
+1 800 382 2527 (Tel)  
+1 714 901 1264 (Fax)  
[www.hycorbiomedical.com](http://www.hycorbiomedical.com)

**Advena Ltd.**  
Pure Offices  
Plato Close  
Warwick CV34 6WE  
U.K.  
+44(0) 1926 800153 (Tel)

### Performance Data/Performances/Typische Ergebnisse/Caratteristiche/Datos de actuación.

	Manual	Hytec
Analytical sensitivity/Limite de détection/Analytische Empfindlichkeit/Sensibilità analitica/Sensibilidad analítica	5.65 u/ml	1.416 u/ml
Relative specificity/Spécificité relative/Spzifitat/Specificite/ Especificidad	97.8%	100%
Relative sensitivity/Sensibilité relative/ Empfindlichkeit/ Sensibilità/ Sensibilidad relativa	95.0%	66.7%
Intra-assay variation/ la reproductibilité intra-lot/Intra Testvariationen/Riproducibilità intralotto/Variación intraanálisis	A 1.3%	A 3.3%
	B 4.0%	B 1.7%
	C 1.3%	C 2.1%
Inter-assay variation/ la reproductibilité inter-lot/ Intra Testvariationen /Riproducibilità interlotto/ Variación interanálisis	A 8.1%	A 11.6%
	B 10.4%	B 7.0%
	C 9.9%	C 6.9%

	English	Français	Deutsch	Italiano	Español
<b>LOT</b>	Batch / Lot code	Code du lot	Chargenbezeichnung	Codice del lotto	Código de lote
	Expiry / Use by	Date du expiration	Verwendbar bis	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Manufactured by	Fabrique par	Hergestellt von	Fabbricato da	Fabricado por
	Store at	Conservé à	Lagerung bei	Conservare a	Conservar a
	See instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso
<b>IVD</b>	For in vitro diagnostic use only	Pour utilisation in vitro uniquement	Nur zur in vitro Verwendung	Per uso diagnostico in vitro	Sólo para el uso diagnóstico in vitro
<b>CONTROL-</b>	Negative control	Contrôle négatif	Negativ Kontrolle	Controllo negativo	Control negativo
<b>CONTROL+</b>	Positive control	Contrôle positif	Positiv Kontrolle	Controllo positivo	Control positivo
<b>REF</b>	Catalogue number	Code produit	Bestellnummer	Numero di catalogo	Número de catálogo
<b>ECIREP</b>	Authorized representative	Représentant Autorisé	Autorisierter Représentant	Rappresentante Autorizzato	Representante Autorizado
	Contains sufficient for <> tests	Contenu suffisant pour <> tests	Enthält ausreichend Reagenzien für <> Tests	Contenuto sufficiente per <>test	Contiene lo necesario para <> test
<b>CAL</b>	Calibrator	Calibrateur	Kalibrator	Calibratore	Calibrador
<b>CONJ</b>	Conjugate	Conjugué	Konjugat	Conjugate	Conjugar
<b>MT PLATE</b>	Microtiter plate	Plaque de microtitration	Mikrotiterplatte	Piatto Microtiter	Plato Microtiter
<b>SAMPLEDIL</b>	Sample diluent	Diluant	Proben verdüner	Diluire prova	Diluir muestra
<b>BUF WASH 20X</b>	Wash buffer Concentrate	Solution de lavage Concentré	Waschpuffer Konzentrat	lavari di tampone concentrare	lavado de defensa concentrar
<b>SUBS</b>	Substrate	Substrat	Substrat	Substrato	Substrato
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution	Solution d'arrêt	Stop Plösung	terminare la soluzione	Parar la solución