

**LOUISVILLE APL DIAGNOSTICS, INC.**  
2622 NASA Pkwy Ste G2, Seabrook TX 77586 USA  
**LAPL ELISA™ aβ<sub>2</sub>GPI IgM HRP Kit**



**REF** LAPL-K-HRP-aβ<sub>2</sub>GPI-1M

ESTA

Una prueba de Enzimo Inmunoensayo  
Para la detección de Anticuerpos Anti-β<sub>2</sub> Glicoproteína I  
IgM

PAGINA

**IVD** Para uso Diagnóstico *In Vitro*

ESTA

Asistencia Técnica  
Tel: 770-455-7129  
Fax: 770-455-6499  
Atención al Cliente: 800-624-3192  
EE.UU. & Canadá solamente  
Email: [support@louisvilleapl.com](mailto:support@louisvilleapl.com)  
Comentarios: [feedback@louisvilleapl.com](mailto:feedback@louisvilleapl.com)  
Website: [www.louisvilleapl.com](http://www.louisvilleapl.com)

INTENCIONALMENTE



Corgenix, Inc.  
11575 Main Street, Suite 400  
Broomfield, Colorado 80020, USA

EN

BLANCO



**EC REP**  
MT Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert/Germany

ES

# MANUAL DE INSTRUCCIONES LAPL ELISA™ aβ<sub>2</sub>GPI IgM HRP Kit

INDICE	Página
1 – Indicaciones .....	4
2 – Explicación del ensayo.....	4
3 – Principio del método.....	4
4 – Reactivos.....	4
5 – Advertencias y precauciones .....	5
6 – Obtención y preparación de muestras .....	6
7 – Instrucciones de uso .....	6
A. Materiales provistos .....	6
B. Materiales necesarios pero no suministrados .....	6
C. Notas sobre el procedimiento.....	7
D. Preparación del reactivo.....	8
E. Procedimiento del ensayo .....	8
8 –Resultados .....	9
A. Curva de calibración multipuntual .....	10
9 – Control de calidad .....	10
10 – Rango normal.....	11
11 – Limitaciones de la prueba .....	11
12 – Garantía .....	11

## IgM Anti-Beta 2 Glycoprotein I Semi-Quantitative Test Kit

### 1. INDICACIONES

#### Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

El *Kit LAPL ELISA™ aβ<sub>2</sub>GPI IgM HRP* es un test de diagnóstico enzimoinmunoensayo (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM anti-beta 2 glicoproteína I (β<sub>2</sub>GPI) en suero o plasma citratado (citrato de sodio al 3,2%) humanos.

### 2. EXPLICACION DEL ENSAYO

El *Kit LAPL ELISA™ aβ<sub>2</sub>GPI IgM HRP* se utiliza para la detección y semicuantificación de anticuerpos IgM anti-β<sub>2</sub>GPI en individuos con lupus eritematoso diseminado (LED) y enfermedades seudolúpicas (síndrome antifosfolípido).

### 3. PRINCIPIO DEL METODO

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero o plasma, los calibradores y los controles se incuban en micro-pocillos recubiertos de β<sub>2</sub>GPI humana purificada. La incubación permite que los anticuerpos anti-β<sub>2</sub>GPI presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Después de retirar mediante lavado las proteínas séricas o plasmáticas no retenidas, se añaden anticuerpos específicos para IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (HRP); estos anticuerpos específicos forman complejos con los anticuerpos retenidos en β<sub>2</sub>GPI. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo una solución de tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos anti-β<sub>2</sub>GPI.

Los resultados se obtienen leyendo la D.O. (densidad óptica o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministran sueros calibradores con las concentraciones de anticuerpos IgM anti-β<sub>2</sub>GPI expresadas en unidades M. Para la calibración multipuntual, realice un análisis de regresión lineal con los valores de los calibradores respecto a las D.O. de los calibradores. Los controles y los resultados de pacientes se determinan a partir de la curva de calibración. Estas unidades están homologadas con las preparaciones de referencia disponibles.

### 4. REACTIVOS

El *Kit LAPL ELISA™ aβ<sub>2</sub>GPI IgM HRP* de 96 micro-pocillos contiene los siguientes reactivos:

Conserve todos los reactivos entre 2 y 8°C. No los congele.

- 12 x 8 micro-pocillos recubiertos de β<sub>2</sub>GPI estabilizada (de suero humano). (12x8 Antigen Coated Microwells)
- 60 ml de diluyente de la muestra IV (solución verde azulada). (Sample Diluent IV)

- 3 frascos de 0,250 ml de suero calibrador\* IgM  $\beta$ 2GPI (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humano); véase en la etiqueta del frasco la concentración de anticuerpo en unidades M. ( IgM Calibrador 1, IgM Calibrador 2, IgM Calibrador 3)
- 0,250 ml de suero humano de control positivo\* de IgM  $\beta$ 2GPI; los rangos de la unidad M esperados se especifican en la etiqueta del frasco. ( IgM Positive Control)
- 0,250 ml de suero humano de control normal\*; los rangos de la unidad M esperados se especifican en la etiqueta del frasco. ( IgM Normal Control)
- 15 ml de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP (solución roja). ( IgM HRP-Conjugated Antibody)
- 15 ml de solución de sustrato de un componente (TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); listo para su uso. (Substrate TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N). (Stopping Solution 0.36N sulfuric acid)
- 2 envases de 30 ml de concentrado de lavado (tampón fosfato PBS 33x y Tween). (Wash Concentrate PBS/Tween 20 (33x))

\*PRECAUCIÓN: Contiene de azida sódica

## 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

1. El material de origen humano empleado para preparar los calibradores y los controles incluidos con este equipo se ha examinado y resultó negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH 1 y 2 requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma, ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables cuando manipule reactivos del kit y lávese minuciosamente las manos después de su uso.
5. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías. 6. Una solución de sustrato de un componente puede causar irritación ocular o cutánea. Utilice guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.

6. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente: Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).



Irritante



Riesgo biológico

## 6. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

**Como matriz de muestra debe emplearse suero o plasma citratado (citrate de sodio al 3,2%).**

La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2 y 8°C. Si fuera necesario conservar las muestras durante más de 72 horas, deben congelarse a una temperatura igual o inferior a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida. No utilice suero o plasma hemolizado, icterico o lipémico, ya que puede producir resultados erróneos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

Si se utiliza plasma citratado, la sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células inmediatamente mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante debe extraerse cuidadosamente tras la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas. Se recomienda repetir los pasos de centrifugación y separación para minimizar la contaminación con plaquetas. Los trombocitos disueltos o deteriorados por el tiempo pueden producir resultados aberrantes. Si no se van a analizar inmediatamente, las muestras de plasma deben almacenarse como se ha descrito para el caso del suero.

## 7. INSTRUCCIONES DE USO

### 7. A. Materiales provistos

Véase una lista completa del *Kit LAPL ELISA™  $\alpha\beta$ 2GPI IgM HRP*; en la sección «4. Reactivos».

### 7. B. Materiales necesarios pero no suministrados

1. Agua para reactivos para preparar una solución de lavado PBS (2L)
2. Cilindros graduados
3. Pipetas de precisión capaces de administrar entre 10 y 1000  $\mu$ l, con puntas apropiadas
4. Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
5. Frascos o botellas de 1 litro

6. Lave los envases, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, con un sistema automático o semiautomático de lavado
7. Guantes desechables
8. Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble)
9. Pipetas multicanal capaces de administrar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
10. Tubos de microdilución y soporte de tubos de microdilución de 96 pocillos para diluciones de muestra y para la aplicación rápida a la placa de micro-pocillos

### 7. C. Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero o plasma y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones de los calibradores, los controles y los sueros de prueba deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo de agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua para reactivos al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o a borrarse con respecto a aire o a este pocillo de agua.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión hacia el fondo de los micro-pocillos apretando una botella de plástico de punta. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automático de placas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de solución de lavado, la solución de sustrato puede desarrollar un color inconsistente.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de administrar las soluciones a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todos los calibradores, controles y muestras deben aplicarse en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra. Se recomiendan periodos de

incubación de 30 minutos. No obstante, para este formato se pueden utilizar incubaciones de hasta 40 minutos.

9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26°C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. No utilice componentes provenientes de equipos con diferentes números de lote.

### 7. D. Preparación del reactivo

**Solución de lavado (PBS/Tween):** Mida 30 ml de concentrado para lavado y dilúyalos en agua para reactivos hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser  $7,35 \pm 0,1$ . Conserve la solución de lavado no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8°C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.

### 7. E. Procedimiento del ensayo

1. La prueba utiliza una curva de calibración con cuatro puntos. Se debe usar un control blanco (Calibrador 4) de reactivo con cada ensayo para lo cual se añade el diluyente de muestra sin suero a una cubeta. Esta cubeta es luego procesada de la misma forma que las cubetas con muestras durante el ensayo.
2. Retire del marco las tiras de micro-pocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
3. Prepare una dilución 1:50 de los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes en el diluyente de muestras (solución verde azulada); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 490 µl de diluyente de muestras es igual a una dilución de muestra de 1:50.
4. Añada 100 µl de calibradores diluidos (incluidos el reactivo testigo y el calibrador 4), controles y muestras de pacientes a los micro-pocillos correspondientes.
5. Incúbese durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micro-pocillos y vacíe el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micro-pocillos.
6. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado. Cada pocillo debe llenarse con solución de lavado en cada uno de los lavados. Invierta los micro-pocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. Para retener los módulos de micro-pocillos durante el lavado, apriete el marco en las partes superior e inferior de los lados de mayor longitud. Seque con papel secante para retirar

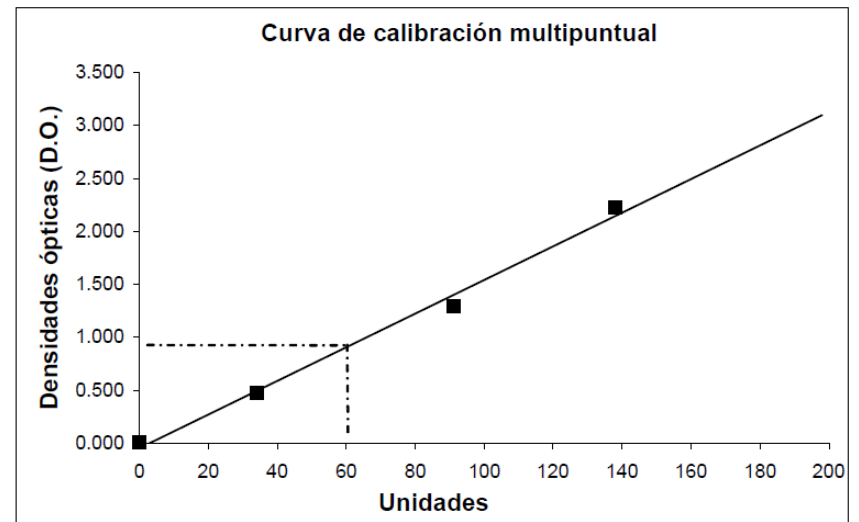
los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.

7. Añada 100 µl de solución de conjugado de anticuerpos anti- IgM humana y HRP (azul) a los pocillos.
8. Incúbase durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micro-pocillos y vacíe la solución conjugada.
9. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo, como en el paso 6. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con toallas absorbentes tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
10. Añada 100 µl de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añada el sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
11. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir el ácido a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se añadió el sustrato. El sustrato azul se volverá amarillo y la solución incolora permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a un pocillo testigo de aire o agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm (con referencia de 650 nm si se utiliza un haz doble). Los valores de la D.O. deben medirse en los 5 minutos posteriores al añadido de la solución de parada.

## 8. RESULTADOS

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión lineal o de regresión polinómica cuadrática/de 2º orden con los cuatro valores del calibrador frente a la densidad óptica (O.D.) para cada calibrador. (Véase en la etiqueta del frasco las unidades para G.) El calibrador 4 (diluyente de muestras) es igual a 0 unidades M.
3. La curva del calibrador puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas. Para evitar los valores negativos, se recomienda utilizar una intersección en cero al generar la línea de regresión. Si no se dispone de esta opción, los valores negativos se indicarán como ceros. Cuando se genera la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados utilizando una intersección de cero.
4. Determine los valores de la muestra de controles y pacientes obtenidos a partir de la curva del calibrador.
5. Ejemplo de calibración con curva multipuntual.

## 8. A. Curva de calibración multipuntual



Usando la curva de calibración suministrada, la D.O. de una muestra de 0,860 a 450 nm correspondería a un valor calculado de 60 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo y no debe usarse para calcular los resultados del paciente. Debe realizarse una nueva curva de calibración con cada proceso de prueba.

## 9. CONTROL DE CALIDAD

1. El valor de la D.O. del calibrador 2 debe ser 0,600 como mínimo para garantizar que el equipo funcione adecuadamente. Las lecturas de D.O. del calibrador 2 inferiores a 0,600 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
2. La D.O. del calibrador 4 o del reactivo testigo debe ser inferior a 0,050 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto a aire o a un pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,050 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
3. Los valores de anti-β2GPI obtenidos con el suero control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del frasco. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Los valores de la D.O. de los duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios valores umbral para la población de pacientes correspondiente.
6. Las muestras con valores de anti-β2GPI de más de 200 unidades M pueden especificarse como «más de 200 unidades M» o deberán repetirse utilizando una dilución (por ejemplo 1:5 o 1:10) con diluyente de muestra y luego diluyendo cada dilución como una muestra (1:50). Para obtener el

valor final se deberá multiplicar el valor de cada dilución por su factor de dilución.

7. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

## 10. RANGO NORMAL

Se comprobaron los anticuerpos IgM anti- $\beta$ 2GPI de las muestras de suero de 120 donantes de sangres sanos. Se estableció el siguiente rango normal:

- Menos de 20 unidades M

## 11. LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Si los hallazgos clínicos indican la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y el paciente resulta negativo para los anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI, algunos investigadores recomiendan analizar la presencia de anticuerpos anticardiolipina, anticuerpos antifosfatidilserina y anticoagulante lúpico para confirmar el resultado negativo. Un paciente puede considerarse positivo para los anticuerpos antifosfolipídicos si se obtienen resultados positivos en una o en todas las pruebas.

## 12. GARANTÍA

Se garantiza que este producto funcionará según se describe en este prospecto. El fabricante desautoriza cualquier garantía implícita de comerciabilidad o aptitud para un uso particular, y en ningún caso se hará responsable de daños emergentes.

**Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al 1-800-624-3192.**

**Fuera de los EE.UU., llame al +1-770-455-7129, envíe un fax al +1-770-455-6499, o envíe un correo electrónico a [support@louisvilleapl.com](mailto:support@louisvilleapl.com).**

Louisville APL Diagnostics, Inc.

*Revisión #4 – Marzo 31, 2013*

REF

LAPL-K-HRP-a $\beta$ 2GPI-1M