



DCM114-8
Ed. 01/2024

Anti Phospholipid Screen

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi anti fosfolipidi nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

Σ $\Sigma = 96$ test

REF DKO114

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Il dosaggio Anti Phospholipid Screen è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di auto-anticorpi di classe IgG e IgM diretti contro fosfolipidi anionici del siero mediati dalla β -glicoproteina (Cardiolipina, Fosfatidil serina, Fosfatidil inositolo, Acido fosfatidico, Fosfatidil colina, Lisofosfatidil colina e Fosfatidil etanol-ammina) su sul siero o nel plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi di aumentato rischio di trombosi in pazienti con Lupus Eritematosus Sistemico (LES) o disordini simili.

2. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

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

Con l'acronimo "aPL" (anticorpi anti-fosfolipidi) si intendono impropriamente anticorpi diretti contro fosfolipidi carichi negativamente quali la Cardiolipina (CL), Fosfatidil serina (PS) Fosfatidil inositolo (PI) e Acido fosfatidico (PA); secondo una accezione più corretta del termine, vanno intesi come anticorpi anti-fosfolipidi quegli anticorpi diretti contro il complesso tra β 2GPI e i fosfolipidi anionici in grado di legarsi al dominio quinto della β 2GPI. Tra questi, la Cardiolipina è il fosfolipide usato più comunemente come antigene per dosare gli aPL con metodo ELISA. Anticorpi diretti contro il complesso tra β 2GPI e fosfolipidi carichi negativamente, quali Fosfatidil serina (PS) Fosfatidil inositolo (PI) e Acido fosfatidico (PA) vengono misurati nel laboratorio diagnostico.

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

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti Phospholipid Screen è un test immunoenzimatico indiretto (ELISA) in cui i campioni dei pazienti, i calibratori o i controlli sono incubati su piastre per microtitolazione rivestite con i complessi antigenici formati da fosfolipidi anionici e la β 2-Glicoproteina (fase solida). Durante l'incubazione, gli anticorpi presenti nel campione di test si legano ai complessi antigenici. Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida.

Una successiva incubazione si verifica con anti-IgG o anti-IgM umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP), che si lega agli anticorpi immobilizzati. Viene eseguita un'ulteriore fase di lavaggio per rimuovere il coniugato in eccesso. Quindi, una soluzione di substrato cromogenico contenente TMB viene erogata nei pozzetti che reagisce con l'HRP coniugato e si sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi IgG o IgM nel campione.

La concentrazione di anticorpi anticorpi IgG o IgM nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

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

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, BSA 3%

CAL0	REF DCE002/11406-0
CAL1	REF DCE002/11407-0
CAL2	REF DCE002/11408-0
CAL3	REF DCE002/11409-0
CAL4	REF DCE002/11410-0

2. Controlli (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno)

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$, BSA 3%

Controllo Positivo	REF DCE045/11402-0
Controllo Negativo	REF DCE045/11401-0

3. Sample Diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1M, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$
REF DCE053-0

4. Conjugate IgG (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, ProClin $\geq 0,0015\%$
REF DCE002/11402-G

5. Conjugate IgM (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgM coniugate con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, ProClin $\geq 0,0015\%$
REF DCE002/11402-M

6. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Complessi antigenici di fosfolipidi e β 2-Glicoproteina adsorbiti su micropiastra
REF DCE002/11403-0

7. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle),
ProClin $< 0,0015\%$
REF DCE004-0

8. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE005-0

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

Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4, ProClin $> 0,0015\%$
REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 ($> 0,0015\%$, $< 0,06\%$) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori, controlli e diluente per campioni) contengono piccole quantità di l'azoturo di sodio $< 0,1\%$ può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a $2-8^\circ\text{C}$ nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente ($22-28^\circ\text{C}$) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le

prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- **AVVERTENZA: il reagente coniugato è progettato per garantire la massima sensibilità per la dose e può essere contaminato da agenti esterni se non utilizzato correttamente;** pertanto, si raccomanda di utilizzare materiali di consumo monouso (puntali, flaconi, vassoi, ecc.). Per le dosi divise, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria e non reintrodurre alcun prodotto di scarto nel flacone originale. Inoltre, **per le dosi erogate con l'ausilio di dispositivi automatici e semiautomatici,** prima di utilizzare il coniugato, è consigliabile pulire il sistema per la gestione dei fluidi, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci per evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è altamente raccomandata quando il kit viene elaborato con analizzatori non dotati di puntali monouso.** A tale scopo, DiaMetra fornisce un reagente di decontaminazione separato per la pulizia degli aghi.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, i calibratori sono stabili a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderla immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero o plasma.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	5 giorni
-20 °C	6 mesi

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

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

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

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.3. Preparazione del coniugato

I coniugati sono pronti per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione degli autoanticorpi di classe IgG o IgM contro gli antifosfolipidi può essere eseguita in campioni di siero o plasma umano.

Tutti i campioni di siero o plasma devono essere prediluiti con diluente per campione 1:100; ad esempio, 10 µL di campione devono essere diluiti con 990 µL di diluente per campione.

Non sono necessari campioni a digiuno e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.

- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Lavaggio: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁵.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**. È possibile utilizzare un adattamento uniforme della curva spline o un grafico doppio-logaritmico che includa il calibratore 0. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

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

12. VALORI ATTESI

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

	IgG (AU/mL)	IgM (AU/mL)
Normale	< 10	< 10
Elevato	≥ 10	≥ 10

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di

stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

13. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

13.1. Precisione e riproducibilità

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

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

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

Campione	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	1,03	5,9	1,31	7,4
Inter-assay	0,26	9,2	5,25	11,7

	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	0,61	7,6	1,97	5,9
Inter-assay	0,15	7,1	2,98	6,6

13.2. Sensibilità:

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

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

13.3. Specificità:

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

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

13.4. Limite di rilevanza:

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

14. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁶. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.
- La presenza nel campione di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline può determinare delle reazioni aspecifiche con conseguenti risultati falsi positivi.

15. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheumat.* 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. *Zeitschrift für Klinische Medizin* 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. *Blood*, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33.

17. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

18. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM114-8



DCM114-8
Ed. 01/2024

Anti Phospholipid Screen

for routine analysis

Quantitative determination of autoantibodies against phospholipids in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO114

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Anti Phospholipid Screen is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of IgG and IgM class autoantibodies against β 2-glycoprotein mediated anionic phospholipids (including Cardiolipin, Phosphatidyl serine, Phosphatidyl inositol, Phosphatidic acid, Phosphatidyl choline, Lyso-phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine) in human serum or plasma from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of increased risk of thrombosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) or similar disorders.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

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

Some years later the role of a cofactor has been investigated, the β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) also said β 2GPI, and its interactions with anionic phospholipids in human serum / plasma. This cofactor is a β -globulin with a molecular weight of 50 kDa that has the concentration of 200 μ g / mL in plasma. The β 2GPI is involved in the regulation of blood coagulation, inhibiting the intrinsic way. β 2GPI *in vivo* is associated with negatively charged substances such as anionic phospholipids, heparin and

lipoproteins. The region that binds phospholipids is in its fifth domain.

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

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

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Anti Phospholipid Screen assay is an indirect enzyme immunometric assay (ELISA) where patient samples, calibrators or controls are incubated on microtitre plates coated with antigenic complex between anionic phospholipids and β 2-Glycoprotein (solid phase). During the incubation, antibodies present in the test sample bind to the antigenic complex. After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing.

A subsequent incubation occurs with either anti-human IgG or anti-human IgM conjugated with horseradish peroxidase (HRP), which binds to the immobilised antibodies. A further wash step is performed to remove excess conjugate. Then, a chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells which reacts with the conjugated HRP and a blue colour develops that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The level of colour is directly proportional to the concentration of IgG or IgM antibodies present in the original sample.

IgG or IgM concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vial, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 <0.1%, BSA 3%
CAL0 REF DCE002/11406-0
CAL1 REF DCE002/11407-0
CAL2 REF DCE002/11408-0
CAL3 REF DCE002/11409-0
CAL4 REF DCE002/11410-0
2. Controls (2 vials, 1.2 mL each)
Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 <0.1%, BSA 3%
Positive Control REF DCE045/11402-0
Negative Control REF DCE045/11401-0
3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)
Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 <0.1%
REF DCE053-0
4. Conjugate IgG (1 vial, 15 mL)
Anti- human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP). ProClin >0.0015% REF DCE002/11402-G
5. Conjugate IgM (1 vial, 15 mL)
Anti- human IgM conjugated with horseradish peroxidase (HRP). ProClin >0.0015% REF DCE002/11402-M
6. Coated Microplate (1 microplate breakable)
Antigenic phospholipid and β 2-Glycoprotein complexes antibodies adsorbed on microplate REF DCE002/11403-0
7. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)
ProClin <0.0015% REF DCE004-0
8. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
9. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4. ProClin >0.0015%
REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Precision Pipetting Devices
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators, controls and sample diluent) contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) <0.1% which may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/ H_2O_2 to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 – 8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 – 28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of

samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinisation and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analysers which are not equipped with disposable tips.**
For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the calibrators are stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum or plasma samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	5 days
-20°C	6 months

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The calibrators contain both IgG and IgM antibodies, are ready for use and have the following concentration:

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

The controls are ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugates are ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “10X Conc. Wash Solution” with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

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

9.4. Preparation of Samples

The determination of IgG or IgM class autoantibodies against anti- phospholipids can be performed in human serum or plasma samples.

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

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

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

(C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Control		100 µL	
Diluted sample		100 µL	

Incubate 60 minutes at room temperature (+22 – 28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

Conjugate (IgG or IgM)	100 µL	100 µL	
---------------------------	--------	--------	--

Incubate 30 minutes at room temperature (+22 – 28°C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Washing: follow the same indications of the previous point.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 15 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁵.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Calibrator 0 is required**. A smoothed spline fit including Calibrator 0 can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

The Positive Control are intended to monitor for substantial reagent failure and they will not ensure precision at the assay cut-off.

12. EXPECTED VALUES

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

	IgG (AU/mL)	IgM (AU/mL)
Normal	< 10	< 10
Elevated	≥ 10	≥ 10

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

13.1. Precision and reproducibility

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

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

Sample	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	1.03	5.9	1.31	7.4
Inter-assay	0.26	9.2	5.25	11.7

	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-assay	0.61	7.6	1.97	5.9
Inter-assay	0.15	7.1	2.98	6.6

13.2. Sensitivity

The clinical sensitivity of Anti Phospholipid Screen IgG assay is 92.3%.

The clinical sensitivity of Anti Phospholipid Screen IgM assay is 68.8%.

13.3. Specificity

The clinical specificity of Anti Phospholipid Screen IgG assay is 84.6%.

The clinical specificity of Anti Phospholipid Screen IgM assay is > 99.9%.

13.4. Detection Limit

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

14. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁶. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.
- The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay.

15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

16. BIBLIOGRAPHY

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumat. 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. Clin. Exp. Immunol. 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siebert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. Zeitschrift für Klinische Medizin 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. Blood, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27-33

17. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

18. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM114-8



DCM114-8
Ed. 01/2024

Anti Phospholipid Screen

para el análisis de rutina

Determinación cuantitativa de autoanticuerpos anti-fosfolípidos en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO114

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo Anti Phospholipid Screen es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de autoanticuerpos de tipo IgG e IgM contra los fosfolípidos aniónicos mediados por la $\beta 2$ glicoproteína, incluyendo cardiolipina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, fosfatidil colina, lisofosfatidil colina y fosfatidil etanolamina. en suero o plasma humano de una población adulta. El ensayo está diseñado para uso diagnóstico *in vitro*, como coadyuvante en el diagnóstico de mayor riesgo de trombosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o trastornos similares. Los resultados deben usarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio como ayuda. en El diagnóstico de mayor riesgo de trombosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o trastornos similares.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

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

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

En años más recientes, se investigó el papel de un cofactor, la proteína $\beta 2$ -glicoproteína I (apolipoproteína H) también llamada $\beta 2$ GPI, y su interacción con los fosfolípidos aniónicos contenidos en el suero o plasma humanos. Este cofactor es una β -globulina con peso molecular 50 kDa que se encuentra en el plasma en concentración aproximada de

200 μ g/mL. Se descubrió que $\beta 2$ GPI interviene en la regulación de la coagulación de la sangre, inhibiendo la vía intrínseca. *In vivo*, la $\beta 2$ GPI está asociada a sustancias de carga negativa, por ejemplo fosfolípidos aniónicos, heparina y lipoproteínas. La región que liga los fosfolípidos está ubicada en su quinto dominio.

Con el acrónimo "aPL" (anticuerpos anti-fosfolípidos) se identifican impropriamente anticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa como la cardiolipina (CL), la fosfatidil serina (PS), el fosfatil inositol (PI) y el ácido fosfatídico (PA); según una acepción más correcta del término, se entiende por anticuerpos anti-fosfolípidos aquellos anticuerpos dirigidos contra el complejo formado por la $\beta 2$ GPI y los fosfolípidos aniónicos capaces de ligarse al dominio quinto de la $\beta 2$ GPI. De éstos, la cardiolipina es el fosfolípido utilizado más frecuentemente como antígeno para dosificar los aPL con el método ELISA. En el laboratorio clínico se miden los anticuerpos contra el complejo de $\beta 2$ GPI y fosfolípidos de carga negativa, tales como fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI) y ácido fosfatídico (PA).

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

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti Phospholipid Screen es un ensayo inmunométrico enzimático indirecto (ELISA) en el que autoanticuerpos de clase IgG o IgM en suero humano se dirigen contra el complejo antigénico entre los fosfolípidos aniónicos y la $\beta 2$ -glicoproteína (anticuerpo) que están recubiertos en la microplaca (fase sólida). En el primer paso, los anticuerpos de los calibradores, controles o muestras de pacientes prediluidas se unen a la superficie interna de los pocillos. Después de una incubación de 60 minutos, la microplaca se lava para eliminar los componentes del suero no reactivos.

Se produce una incubación posterior con IgG anti-humana o IgM anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), que se une a los anticuerpos inmovilizados. Se realiza un paso de lavado adicional para eliminar el exceso de conjugado.

Una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB se dispensa a continuación a los pocillos. Tras un paso más de incubación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de los anticuerpos IgG o IgM de la muestra.

La concentración de anticuerpos IgG o IgM en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 viales de 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1 %, BSA 3%

CAL0 **REF** DCE002/11406-0

CAL1 **REF** DCE002/11407-0

CAL2 **REF** DCE002/11408-0

CAL3 **REF** DCE002/11409-0

CAL4 **REF** DCE002/11410-0

2. Control (2 viales de 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1 %, BSA 3%

Control negativo **REF** DCE045/09101-0

Control positivo **REF** DCE045/09102-0

3. Diluyente de muestras (1 vial, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1 %

REF DCE053-0

4. Conjugado IgG (1 frasco, 15 mL)

Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%, ProClin $\geq 0,0015\%$ **REF** DCE002/11402-G

5. Conjugado IgM (1 frasco, 15 mL)

Anti h-IgM conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%, ProClin $\geq 0,0015\%$ **REF** DCE002/11402-M

6. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

1 microplaca rompible con el complejo antigénico de fosfolípidos y $\beta 2$ glicoproteína adsorbidos

REF DCE002/09103-0

7. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel).

Contiene ProClin™ <0,0015% **REF** DCE004-0

8. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

9. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4, contiene ProClin™ >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.

- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.

-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.

- Algunos reactivos (conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores, control y diluyente de muestras) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN_3) <0,1% que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.

- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente **validado para su uso previsto**.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **ADVERTENCIA: el reactivo conjugado está diseñado para garantizar la máxima sensibilidad de la dosis y puede contaminarse con agentes externos si no se utiliza correctamente;** por lo tanto, se recomienda utilizar consumibles desechables (puntas, frascos, bandejas, etc.). Para dosis divididas, tome la cantidad exacta de conjugado necesaria y no vuelva a introducir ningún producto de desecho en el frasco original. Además, **para las dosis dispensadas mediante dispositivos automáticos y semiautomáticos,** antes de utilizar el conjugado, es aconsejable limpiar el sistema de manipulación de fluidos, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteización y descontaminación sean eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento es muy recomendable cuando el kit se procesa con analizadores que no están equipados con puntas desechables.**
Para ello, DiaMetra proporciona un reactivo de descontaminación independiente para la limpieza de las agujas.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras,

los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, los calibradores están estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero o plasma.

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	5 días
-20 °C	6 mese

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

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

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

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.3. Preparación del conjugado

Los conjugados están listos para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de autoanticuerpos de clase IgG o IgM contra antifosfolípidos se puede realizar en muestras de suero o plasma humano.

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

Las muestras en ayunas no son necesarias ni se requieren preparaciones especiales de las muestras.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación. No se recomienda el análisis de muestras de suero o plasma inactivadas por calor.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos. Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2- 8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (22- 28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente. Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	100 µL	100 µL	

Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (22- 28 °C).
Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.
Lavado: siga las mismas indicaciones del punto anterior.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca. Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control¹⁵.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**. Se puede usar un ajuste de splines suavizado y un ajuste logarítmico-logarítmico que incluya el calibrador 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

El control negativo y el positivo sirven para controlar un eventual malfuncionamiento de los reactivos y no aseguran la precisión en correspondencia con el valor límite del ensayo.

12. VALORES ESPERADOS

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

	IgG (AU/mL)	IgM (AU/mL)
Normal	< 10	< 10
Alto	≥ 10	≥ 10

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

13.1. Precisión y reproducibilidad

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

La dispensación y el lavado las efectuó manualmente un operador.

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

Muestra	IgG			
	1 SD	1 CV%	2 SD	2 CV%
Intra-ensayo	1,03	5,9	1,31	7,4
Entre-ensayos	0,26	9,2	5,25	11,7

	IgM			
	1 SD	1 CV%	2 SD	2 CV%
Intra-ensayo	0,61	7,6	1,97	5,9
Entre-ensayos	0,15	7,1	2,98	6,6

13.2. Sensibilidad

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

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

13.3. Especificidad

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

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

13.4. Límite de detección:

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

14. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁶. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.
- La presencia en la muestra de complejos inmunes o de otros agregados de inmunoglobulinas puede dar lugar a reacciones no específicas con resultados falsos positivos.

15. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheumat.* 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. *Zeitschrift für Klinische Medizin* 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. *Blood*, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

17. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

18. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM114-8

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