

	ZENIT RA β_2-GLYCOPROTEIN I IgM	Distribuito da 
ISTRUZIONI PER L'USO	   100	

FINALITA' D'USO

Il test *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* è un test immunologico chemiluminescente (CLIA) per la determinazione quantitativa, con strumentazione dedicata *ZENIT RA Analyser*, degli anticorpi specifici di classe IgM diretti contro la β_2 -Glicoproteina I in campioni di siero o plasma umano (EDTA, Eparina).

Questo dosaggio viene impiegato come ausilio diagnostico nella valutazione della sindrome da anti-fosfolipidi (APS).

ATTENZIONE: Qualunque decisione medica non può essere basata sul risultato di questo solo test, ma va fondata sulla valutazione dell'insieme di tutti i dati clinici e di laboratorio disponibili.

SIGNIFICATO CLINICO

La presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) in pazienti con trombosi venose e/o arteriose o in pazienti con complicanze ostetriche è il marker di laboratorio essenziale (assieme al LAC) per la diagnosi della "sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS)"¹.

Secondo i criteri di Sapporo, aggiornati nel 2006¹, la diagnosi di APS può essere definita in presenza di almeno un criterio clinico ed uno di laboratorio.

I criteri di laboratorio prevedono la positività persistente nel tempo (12 settimane) ad un titolo medio/alto di anticorpi anti-cardiolipina (aCL) e/o anticorpi anti- β_2 -Glicoproteina I (a β_2 GPI) e/o anticorpi "lupus anticoagulant" (LAC).

Gli anticorpi aCL e a- β_2 GPI possono essere di isotipo G oppure M ed avere un titolo superiore a 40 U/mL.

La presenza di anticorpi anti-fosfolipidi fu per la prima volta dimostrata nel 1941 in campioni di pazienti con diagnosi sierologica di sifilide². Fu evidenziato che il siero di questi pazienti intereagiva con il fosfolipide cardiolipina, contenuto negli estratti di cuore bovino del test VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) considerato specifico per la diagnosi di sifilide.

La specificità del dosaggio VDRL fu messa in discussione dai numerosi riscontri di falsa positività in campioni di pazienti con malattie autoimmuni sistemiche e in assenza di malattie veneree. Nel 1983 Harris et al.³, utilizzando un metodo ad elevata sensibilità per la determinazione degli anticorpi anti-cardiolipina, trovarono nel 61 % dei pazienti con LES elevate concentrazioni di aCL, dimostrando una significativa correlazione tra livelli di anticorpo e le trombosi venose ed arteriose, il "lupus anticoagulant" e la trombocitopenia.

Nel 1990 due gruppi indipendenti di ricercatori^{4,5} hanno dimostrato che per evidenziare gli anticorpi anti-cardiolipina è indispensabile la presenza della β_2 -Glicoproteina I.

La β_2 -Glicoproteina I ha un peso molecolare di circa 50 kDa, una concentrazione plasmatica di circa 0.15-0.30 mg/mL ed una funzione biologica tuttora oscura (sembra in grado di modulare il metabolismo delle lipoproteine, di interferire in alcune reazioni coagulative ed avere un effetto antiaggregante piastrinico⁶⁻⁹). Recenti studi cristallografici hanno definito la struttura tridimensionale della proteina e la sua organizzazione in 5 domini¹⁰⁻¹¹, fornendo utili informazioni sul funzionamento di questa molecola.

In particolare, il V dominio presenta numerosi residui di lisina che sono responsabili dell'interazione elettrostatica della β_2 -Glicoproteina I con i fosfolipidi anionici delle membrane cellulari¹². Attraverso lo stesso meccanismo avviene "in vitro" il legame tra la β_2 -Glicoproteina e la cardiolipina adsorbita sulla fase solida. E' stato ampiamente dimostrato che gli anticorpi anti-cardiolipina di pazienti con sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi riconoscono una porzione modificata della β_2 -Glicoproteina I; tali autoanticorpi non sono in grado di riconoscere la cardiolipina, la β_2 -Glicoproteina nativa non legata a fasi solide o ad altre strutture^{4,5,13-15}.

Le conoscenze sino ad oggi acquisite ci permettono di definire gli anticorpi anti-cardiolipina come anticorpi in grado di legarsi a neoepitopi generati dal legame tra β_2 -Glicoproteina e cardiolipina adsorbita su una fase solida.

E' stato successivamente dimostrato^{4,16} che gli anticorpi anticardiolipina nei pazienti con malattie autoimmuni possono riconoscere la β_2 -Glicoproteina I direttamente adsorbita su micropiastre di polistirene, trattato UV o irradiato. Anche in questo caso, il riconoscimento della molecola da parte degli autoanticorpi è determinato dalle modifiche strutturali causate dal legame della proteina alla fase solida.

PRINCIPIO DEL METODO

Il kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* per la determinazione quantitativa delle IgM specifiche anti- β_2 -Glicoproteina I utilizza un metodo immunologico indiretto a due step basato sul principio della chemiluminescenza.

La β_2 -Glicoproteina I è utilizzata per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) ed un anticorpo anti-IgM umane è marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato).

Durante la prima incubazione gli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori o nei controlli si legano alla fase solida.

Durante la seconda incubazione il coniugato reagisce con gli anticorpi anti- β_2 -Glicoproteina I IgM sequestrati dalla fase solida.

Dopo ciascuna incubazione il materiale non legato alla fase solida è rimosso mediante aspirazione e susseguente lavaggio.

La quantità di coniugato marcato rimasto legato alla fase solida viene valutata mediante attivazione della reazione di chemiluminescenza e misura del segnale luminoso. Il segnale generato, espresso in unità relative di luce (RLU, Relative Light Unit), è indicativo della concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori e nei controlli.

AUTOMAZIONE

Lo strumento *ZENIT RA Analyser* esegue in automatico tutte le operazioni previste dal protocollo di dosaggio: aggiunta nel contenitore di reazione dei campioni, calibratori, controlli, particelle magnetiche, coniugato e soluzioni di attivazione della chemiluminescenza; separazione magnetica e lavaggio delle particelle; misura della luce emessa.

Il sistema calcola i risultati del dosaggio per i campioni ed i controlli mediante curva di calibrazione memorizzata e stampa un rapporto che include tutte le informazioni relative al dosaggio ed al paziente.

MATERIALI E REAGENTI

Materiali e reagenti forniti

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Particelle magnetiche rivestite con β ₂-glicoproteina I in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti, tensioattivo, Pro-Clin 300 e sodio azide (< 0.1 %) come conservanti.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Anticorpo monoclonale di topo anti-IgM umane marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato), in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti e sodio azide (< 0.1 %) come conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Soluzione Diluente Campioni: Tampone Citrato-Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante giallo, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con bassa concentrazione di anticorpi anti- β ₂-Glicoproteina I IgM in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con elevata concentrazione di anticorpi anti- β ₂-Glicoproteina I IgM in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso.

I reagenti 1, 2 e 3 sono assemblati in un unico insieme che costituisce la cartuccia reagenti.

Le concentrazioni dei Calibratori sono espresse in UA/mL (Unità Arbitrarie) e tarate contro uno standard di riferimento interno. I valori delle concentrazioni, specifici per lotto di prodotto, sono registrati nel DATA DISK inserito nel kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenente le informazioni riguardanti tutti i prodotti della Linea ZENIT RA (Reagenti, Calibratori, Sieri di controllo) aggiornati all'ultimo lotto produttivo con l'esclusione dei prodotti scaduti alla data di compilazione del nuovo DATA DISK.

E' sufficiente conservare il DATA DISK con il numero di lotto più elevato per mantenere aggiornate le informazioni richieste per il corretto funzionamento del sistema.

Materiali e reagenti richiesti ma non forniti nel kit

- | | |
|---|----------------|
| - ZENIT RA Analyzer | Cod. No. 41400 |
| - ZENIT RA Cuvette Cube *
Confezione da 960 cuvette. | Cod. No. 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid *
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 10x. | Cod. No. 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution *
1 bottiglia da 0.5 litri di soluzione 20x. | Cod. No. 41407 |
| - ZENIT RA Trigger Set *
1 flacone da 250 mL di Trigger A (soluzione di preattivazione)
1 flacone da 250 mL di Trigger B (soluzione di attivazione) | Cod. No. 41403 |
| - ZENIT RA D-SORB Solution
Confezione da 2 bottiglie da 1 litro di soluzione pronta per l'uso. | Cod. No. 41436 |
| - ZENIT RA Cartridge Checking System * | Cod. No. 41401 |
| - ZENIT RA Top Cap Set
300 tappi superiori per la chiusura dei contenitori dei calibratori dopo il primo utilizzo. | Cod. No. 41566 |

(*) Lo strumento ZENIT RA Analyzer e gli accessori identificati dall'asterisco sono fabbricati da Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgium e distribuiti da A. Menarini Diagnostics Srl.

Altri Reagenti Raccomandati

ZENIT RA APS IgM CONTROL SET

Cod. No. 41454

3 fiale da 1.5 mL di siero umano negativo e 3 fiale da 1.5 mL di siero umano positivo per anticorpi anti- β 2-Glicoproteina I.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti forniti nel kit *ZENIT RA β 2-GLYCOPROTEIN I IgM* sono solo per uso diagnostico in vitro e non per uso in vivo in uomini o animali.

Questo prodotto deve essere utilizzato in stretta osservanza alle istruzioni riportate nel presente documento da utilizzatori professionali.

Menarini non può essere ritenuta responsabile di perdite o danni generati da un uso non conforme alle istruzioni fornite.

Precauzioni di sicurezza

Questo prodotto contiene materiale di origine animale e pertanto deve essere manipolato come se contenesse agenti infettanti.

Questo prodotto contiene componenti di origine umana. Tutte le unità di siero o plasma utilizzate per la fabbricazione dei reagenti di questo kit sono state analizzate con metodi FDA approvati e trovate non reattive per la presenza di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 ed anti-HIV2.

Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi è in grado di garantire l'assenza di agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto e manipolato come tale.

In caso di imballaggio danneggiato con fuoriuscita dei reagenti provvedere alla decontaminazione dell'area interessata con una soluzione diluita di Ipoclorito di Sodio dopo essersi protetti con idonei dispositivi di protezione individuale (camice, guanti, occhiali).

Provvedere allo smaltimento del materiale utilizzato per la pulizia e dei rifiuti di imballaggio coinvolti nella fuoriuscita, in base alle norme nazionali per lo smaltimento dei rifiuti potenzialmente infetti.

Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può reagire con piombo, rame e ottone piombato formando azidi esplosive nelle tubature, si raccomanda di non eliminare reagenti o rifiuti negli scarichi ma di seguire le norme nazionali in materia di smaltimento rifiuti potenzialmente pericolosi.

Precauzioni operative

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle presenti Istruzioni per l'uso e seguire scrupolosamente quanto indicato nel manuale operativo dello strumento.

I reagenti forniti nel kit devono essere utilizzati esclusivamente con il sistema *ZENIT RA Analyzer*.

I componenti della cartuccia reagenti non possono essere rimossi dalla cartuccia e riassemblati.

Non usare il kit oltre la data di scadenza.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti forniti nel kit sono tutti pronti per l'uso.

CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Conservare i reagenti forniti nel kit a 2-8 °C in posizione verticale ed al buio.

In queste condizioni la cartuccia reagenti ed i calibratori non aperti sono stabili sino alla data di scadenza.

La cartuccia reagenti dopo apertura può essere utilizzata per 60 giorni se conservata in frigorifero a 2-8 °C oppure a bordo macchina.

I calibratori dopo apertura possono essere utilizzati per 60 giorni se conservati in frigorifero a 2-8 °C e se la permanenza a bordo non supera le 6 ore per seduta.

Non congelare i reagenti ed i calibratori.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito su campioni umani di siero e plasma (EDTA - Eparina).

Si sconsiglia l'uso di campioni lipemici, emolizzati e torbidi.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 8 ore, separare il siero o il plasma dal coagulo, dai globuli rossi e dalle provette di separazione con gel.

Prima di essere analizzati i campioni possono essere conservati in frigorifero a 2-8 °C per 7 giorni al massimo.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 7 giorni, conservare i campioni congelati (< - 20 °C).

Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Per ottenere prestazioni analitiche affidabili attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel manuale operativo dello strumento.

Caricamento dei reagenti

Tutti i reagenti forniti nel kit sono pronti per l'uso.

Prima di inserire la cartuccia reagenti nel sistema, il contenitore delle particelle magnetiche deve essere agitato per rotazione orizzontalmente in modo da favorire la risospensione delle particelle. Eseguire l'operazione evitando la formazione di schiuma.

Posizionare la cartuccia reagenti nell'area reagenti dello strumento utilizzando l'apposita guida e lasciare in agitazione per almeno 30 minuti prima dell'uso.

Il posizionamento della cartuccia reagenti determina contemporaneamente la lettura del codice a barre identificativo. In caso di danneggiamento dell'etichetta della cartuccia o in caso di mancata lettura, i dati identificativi della cartuccia reagenti possono essere inseriti manualmente.

Lo strumento mantiene automaticamente in agitazione continua le particelle magnetiche.

Se la cartuccia reagenti viene rimossa dallo strumento, conservarla verticalmente al buio a 2-8 °C.

Caricamento dei calibratori e dei controlli

I calibratori ed i controlli ZENIT RA sono pronti per l'uso. Lasciare i calibratori ed i controlli a temperatura ambiente per 10 minuti ed agitare delicatamente il contenuto, manualmente o mediante vortex, evitando la formazione di schiuma. Non capovolgere il contenitore e non togliere il tappo perforatore di chiusura (tappo giallo per i calibratori e tappi verdi o blu per i controlli).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero utilizzati per la prima volta, premere il tappo perforatore verso il basso sino a completarne la sua corsa. Con questa operazione la membrana che sigilla il contenitore verrà perforata rendendo possibile il prelievo del liquido contenuto. L'avvenuto abbassamento del tappo perforatore è segnalato dalla contemporanea copertura della fascia di colore rosso presente nel lato superiore dell'etichetta (Fig. 1 – Contenitore sigillato e Contenitore perforato).

Nel caso i calibratori o i controlli fossero già stati utilizzati, il contenitore sarà provvisto del tappo superiore (tappo bianco) e la fascia rossa dell'etichetta sarà coperta.

Sullo strumento devono essere caricati esclusivamente i contenitori senza tappo superiore (tappo bianco) e con la fascia rossa dell'etichetta coperta (Fig. 1 – Contenitore perforato).

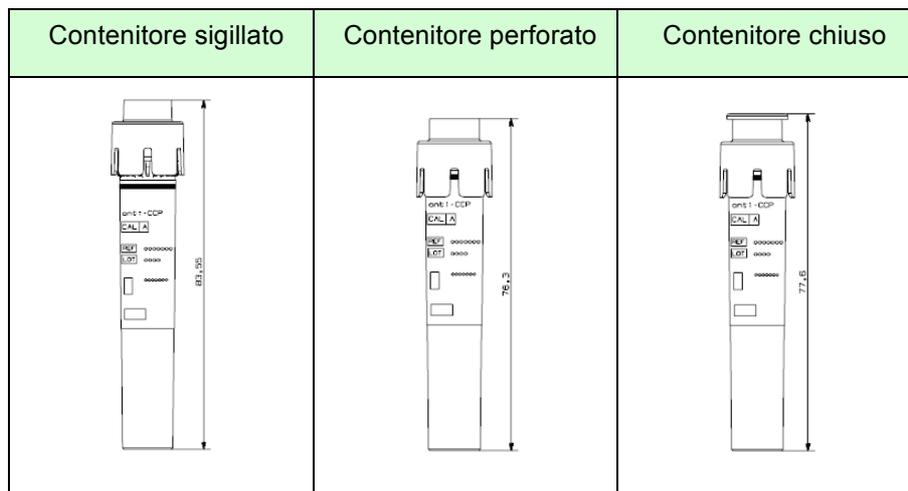
Inserire nello strumento i calibratori o i controlli nell'area campioni dopo lettura del bar code. I dati del bar code possono essere inseriti anche manualmente in caso di danneggiamento dell'etichetta o in caso di mancata lettura.

I valori della concentrazione degli anticorpi IgM anti- β ₂-Glicoproteina I presente nei calibratori o nei controlli sono registrati nel DATA DISK ed automaticamente trasferiti nell'analizzatore. In caso di mancato trasferimento dei dati è possibile il loro inserimento manuale.

Al termine della seduta i contenitori dei calibratori e dei controlli devono essere chiusi con gli appositi tappi superiori (tappi bianchi) e trasferiti a 2-8 °C sino al loro successivo impiego (Fig. 1 – Contenitore chiuso).

I calibratori possono essere utilizzati per un massimo di quattro volte.

Figura 1: Layout contenitore



Caricamento dei campioni

Identificare i campioni utilizzando il lettore di bar code ed inserirli nello strumento, nell'apposito contenitore. In caso di mancanza del bar code sul campione o in caso di mancata lettura, i dati identificativi del campione possono essere inseriti manualmente.

Selezionare per ogni campione i parametri richiesti.

Calibrazione

Lo strumento *ZENIT RA Analyzer* utilizza una curva di calibrazione memorizzata (master curve), generata dal produttore per ogni lotto di cartuccia reagenti.

I parametri delle "master curve", unitamente ai valori delle concentrazioni dei calibratori, sono memorizzati nel DATA DISK e trasferiti nel database dello strumento.

I calibratori A e B sono utilizzati per ricalibrare la "master curve" in funzione sia dello strumento utilizzato che dei reagenti a bordo.

Per eseguire la ricalibrazione analizzare in triplicato i due calibratori A e B ed in singolo i controlli. I valori di concentrazione ottenuti con i controlli permettono di validare la nuova calibrazione.

Una volta che la ricalibrazione della "master curve" sia stata accettata e memorizzata, tutti i campioni successivi possono essere analizzati senza ulteriore calibrazione, tranne nei seguenti casi:

- quando è caricata a bordo dello strumento una cartuccia reagenti con un nuovo lotto;
- quando i valori dei controlli non rientrano nell'intervallo di accettabilità;
- quando è eseguita la procedura di manutenzione dello strumento;
- quando è scaduta la validità della "master curve" ricalibrata.

La validità della "master curve" ricalibrata per il kit *ZENIT RA β 2-GLYCOPROTEIN I IgM* è di 15 giorni.

La gestione della ricalibrazione è attuata in automatico dallo strumento.

Dosaggio

Premere il tasto di avvio.

1. Il sistema aspira 100 μ L di Diluente Campioni, 20 μ L di Particelle Magnetiche, 100 μ L di Diluente Campioni e 6 μ L di campione o controllo (per i calibratori il siero positivo è fornito prediluito con il Diluente Campioni ed il volume prelevato è di 106 μ L). Le soluzioni e la sospensione aspirate sono dispensate nella cuvetta di reazione.
2. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
3. Dopo questa fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate.
4. Nella cuvetta vengono dispensati 200 μ L di coniugato.
5. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
6. Dopo questa ultima fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate e la cuvetta viene trasferita nella camera di lettura.
7. La quantità di coniugato legato alla fase solida, espressa in RLU, è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgM anti- β ₂-Glicoproteina I presente nel campione.
8. Le risposte ottenute sono interpolate sulla curva di taratura e trasformate in concentrazioni.

Campioni con valori di concentrazione più elevati del limite superiore dell'intervallo di misurabilità possono essere diluiti e ritestati. Il nuovo valore ottenuto viene moltiplicato, per ottenere il risultato finale, per il fattore di diluizione utilizzato.

CONTROLLO QUALITA'

Per assicurare la validità del dosaggio, sieri di controllo a differenti livelli di concentrazione (almeno un siero negativo ed un siero positivo) devono essere misurati ogni giorno in cui si esegue il dosaggio.

Se il proprio laboratorio richiede, per la verifica dei risultati del dosaggio, un uso più frequente o un numero più elevato di controlli, seguire le procedure del controllo qualità ivi stabilite.

Se vengono utilizzati i sieri di controllo ZENIT RA, i valori medi attesi ed i limiti di accettabilità sono quelli riportati nel DATA DISK presente anche nella confezione dei controlli.

Qualora venissero utilizzati sieri di controllo diversi, è necessario, prima del loro impiego, definire i valori attesi con reagenti e sistema ZENIT RA.

Qualora il valore dei controlli non rientri nel range di accettabilità specificato, i relativi risultati del dosaggio non sono validi ed i rispettivi campioni devono essere rianalizzati.

In questo caso è necessario eseguire prima della ripetizione del dosaggio una procedura di ricalibrazione.

CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

La concentrazione degli anticorpi IgM anti- β_2 -Glicoproteina I presente nei campioni in esame è calcolata automaticamente dal sistema. I valori possono essere visualizzati mediante lettura sul video o attraverso stampa.

Le concentrazioni sono espresse in UA/mL.

Il calcolo della concentrazione di analita nel campione avviene attraverso lettura della risposta ottenuta per ogni campione su una curva di calibrazione elaborata mediante un sistema di "fitting" logistico a quattro parametri (4PL, Y ponderato), corretta periodicamente in funzione delle risposte ottenute nel dosaggio dei calibratori.

Per informazioni dettagliate su come il sistema calcola i risultati, consultare il manuale operativo del sistema.

Interpretazione dei risultati

Il range di misurabilità del dosaggio *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* è: 0.0 – 300 UA/mL.

I valori inferiori a 0.0 UA/mL sono valori estrapolati e possono essere riportati come "uguali a 0.0 UA/mL".

I valori superiori a 300 UA/mL possono essere riportati come "superiori a 300 UA/mL", o ritestati dopo opportuna diluizione.

I risultati dei campioni possono essere interpretati nel seguente modo:

(UA/mL)	Interpretazione
< 10	Il campione è da considerare Negativo per la presenza di IgM anti- β_2 -Glicoproteina I
≥ 10	Il campione è da considerare Positivo per la presenza di IgM anti- β_2 -Glicoproteina I

I valori sopra riportati sono da considerare solo valori suggeriti. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento.

LIMITI DEL DOSAGGIO

Per scopi diagnostici, i risultati ottenuti con il kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* ed il sistema *ZENIT RA Analyzer* devono essere utilizzati unitamente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

La contaminazione batterica dei campioni e l'inattivazione al calore possono influenzare il risultato del dosaggio.

Gli anticorpi eterofili presenti nei campioni di siero umano possono reagire con i reagenti a base di immunoglobuline, causando interferenze nei dosaggi immunologici in vitro. Questi campioni possono dar luogo a valori anomali se analizzati con il kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM*.

VALORI ATTESI

Sono stati analizzati i campioni di 100 pazienti sani per verificare la presenza di anticorpi IgM anti- β_2 -Glicoproteina I.

98 campioni sono risultati negativi, con un valore medio di 0.4 UA/mL ed una deviazione standard di 0.89 UA/mL.

Con i risultati ottenuti è stato calcolato il "Limit of Blank" (LoB = il più alto valore che possiamo attenderci in una serie di campioni che non contengono l'analita). Il "Limit of Blank", determinato come 95° percentile della popolazione negativa, è risultato pari a 1.8 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 2.

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

Sono stati testati con il kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* un totale di 344 campioni di cui 68 campioni di pazienti affetti da sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS), 46 campioni di pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche reumatiche (7 connettiviti, 15 lupus eritematoso sistemico, 24 artriti reumatoide), 30 campioni di pazienti affetti da varie patologie infettive (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV), 100 campioni di soggetti normali e 100 campioni di donatori.

Nella popolazione presumibilmente negativa (46 campioni di pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche reumatiche, 30 campioni di pazienti affetti da varie patologie infettive, 100 campioni di soggetti normali e 100 campioni di donatori) studiata 11 campioni sono risultati positivi e 265 negativi.

- **Specificità diagnostica: 96.0 % (265/276)**

Nella popolazione presumibilmente positiva (68 campioni di pazienti affetti da sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi) studiata 46 campioni sono risultati negativi e 22 positivi.

- **Sensibilità diagnostica: 32.4 % (22/68)**

Dei 68 campioni di pazienti affetti da sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi, 57 campioni sono risultati positivi con il kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* (85.3 %).

In base ai risultati della specificità e della sensibilità diagnostica, l'**accordo diagnostico è del 83.4 % (287/344)**.

PRESTAZIONI

Avvertenza: i dati presentati non rappresentano le specifiche di funzionamento del kit, ma costituiscono evidenza sperimentale di come il kit funzioni entro tali specifiche nel modo previsto dal produttore.

Precisione e Riproducibilità

La precisione e riproducibilità del kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* sono state valutate impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP5-A2 del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **precisione** è stata calcolata analizzando i risultati di 20 replicati di cinque sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti- β_2 -Glicoproteina I IgM) eseguiti con due diversi lotti di reagenti nella stessa seduta sperimentale.

La concentrazione del siero anti- β_2 -Glicoproteina I IgM negativo (N3) è risultata compresa nell'intervallo da 0.0 a 0.9 UA/mL e da 0.0 a 0.8 UA/mL rispettivamente con il Lotto di reagenti n. 1 e n. 2.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 4 sieri positivi.

Campione	Reagenti Lot. no.	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	23.9	0.63	2.6
	2	25.2	0.53	2.1
P2	1	42.1	1.69	4.0
	2	44.6	2.13	4.8
P3	1	74.9	1.57	2.1
	2	81.8	1.46	1.8
P4	1	152.4	7.44	4.9
	2	154.5	2.96	1.9

La **riproducibilità** è stata calcolata analizzando i risultati della determinazione di cinque sieri (uno negativo e quattro positivi con diverse concentrazioni di anti- β_2 -Glicoproteina I IgM) eseguita in singolo, in 30 sedute diverse, con due diversi lotti di reagenti.

La concentrazione del siero anti- β_2 -Glicoproteina I IgM negativo (N3) è risultata compresa nell'intervallo da 0.6 a 1.8 UA/mL.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 4 sieri positivi.

Campione	Concentrazione media (UA/mL)	SD	CV %
P1	24.8	1.88	7.6
P2	43.4	2.45	5.6
P3	76.3	5.05	6.6
P4	153.3	8.98	5.9

Linearità delle Diluizioni

La linearità delle diluizioni del kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* è stata valutata impiegando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP6-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Sono state dosate diluizioni scalari di 3 sieri a concentrazione elevata di IgM anti- β_2 -Glicoproteina I, eseguite con il Diluente Campioni.

I risultati di questo studio sono riassunti nella seguente tabella.

Campione	Fattore di diluizione	Concentrazione misurata (UA/mL)	Concentrazione attesa (UA/mL)	Recovery %
1	1	168.3	-	(100)
	2	74.0	81.9	90.4
	4	38.4	41.0	93.7
	8	19.1	20.5	93.2
	16	10.4	10.2	102.0
2	1	99.6	-	(100)
	2	51.2	49.8	102.8
	4	26.2	24.9	105.2
	8	13.1	12.5	104.8
3	1	115.0	-	(100)
	2	60.1	57.5	104.5
	4	31.0	28.8	107.6
	8	16.3	14.4	113.2

In ogni caso si rende necessario sottolineare che alcuni sieri, quando misurati a diluizioni diverse, possono fornire risultati non lineari all'interno dell'intervallo di misurabilità essendo il risultato dipendente non solo dalla concentrazione ma anche dall'affinità degli anticorpi presenti nel campione.

Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica del kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM*, espressa come **limite di rilevazione** (*Limit of Detection – LoD*: ossia la più piccola quantità di analita che il metodo è in grado di misurare) è stata valutata utilizzando un protocollo basato sulle linee guida del documento EP17-A del Clinical and Laboratory Standards (CLSI) e la formula per il calcolo $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (dove LoB rappresenta il valore del "Limit of Blank", SD_s la deviazione standard stimata della distribuzione del campione a bassa concentrazione e C_{β} è derivato dal 95 ° percentile della distribuzione standard gaussiana).

Sono stati utilizzati 3 campioni a bassa concentrazione di analita, determinati in singolo con due differenti Lotti di reagenti in 30 esperimenti diversi.

Il Limite di rilevazione del kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgM* è risultato pari a 3.7 UA/mL.

I valori del limite di rilevazione, unitamente a considerazioni di carattere clinico ed ai risultati di comparazione con metodi di riferimento hanno contribuito alla definizione del valore cut-off.

Specificità Analitica: Interferenze

Uno studio basato sulle linee guida del documento EP7-A2 del CLSI ha dimostrato che le prestazioni del dosaggio non sono influenzate dalla presenza nel campione delle sostanze potenzialmente interferenti elencate nella seguente tabella, sino alla concentrazione sperimentata.

Sostanze Potenzialmente Interferenti	Massima concentrazione sperimentata
Bilirubina libera	20 mg/dL
Bilirubina coniugata	28 mg/dL
Emoglobina	1000 mg/dL
Acidi grassi	3000 mg/dL

L'uso di campioni lipemici, emolizzati o torbidi viene comunque sconsigliato.

Specificità Analitica: Reazioni crociate

Per valutare le potenziali reazioni crociate dell'antigene utilizzato per sensibilizzare le microparticelle, è stato condotto uno studio con 24 campioni, tutti con alti livelli di altri autoanticorpi e negativi per anti- β 2-Glicoproteina I IgM.

I campioni utilizzati erano così suddivisi: SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), Istoni (2), Nucleolari (1), Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (2), MPO (1), PR3 (1).

Lo studio non ha mostrato alcuna significativa reazione crociata dell'antigene in fase solida con gli altri autoanticorpi.

Effetto saturazione ad alte dosi

Alcuni metodi immunologici impiegati per la determinazione di campioni contenenti l'analita a concentrazioni estremamente elevate possono fornire livelli apparenti di analita sottostimati (Effetto hook).

Il metodo utilizzato nel kit ZENIT RA β 2-GLYCOPROTEIN I IgM, essendo un metodo a due incubazioni, non risente di tale effetto.

Un campione con concentrazione estremamente elevata (al di sopra dell'intervallo di misura) di IgM anti- β 2-Glicoproteina I ha confermato l'assenza di effetto "hook" sino alla concentrazione di 699 UA/mL.

Sensibilità e Specificità Relative

La presenza di anticorpi anti- β 2-Glicoproteina I IgM è stata determinata utilizzando il kit ZENIT RA β 2-GLYCOPROTEIN I IgM ed un metodo di dosaggio ELISA disponibile in commercio in 240 campioni di cui 65 campioni di pazienti affetti da sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS), 46 campioni di pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche reumatiche, 29 campioni di pazienti affetti da varie patologie infettive e 100 campioni di soggetti normali.

10 campioni hanno dato luogo a risultati discordanti tra il dosaggio ZENIT RA ed il dosaggio ELISA disponibile in commercio.

La **concordanza relativa** è risultata pertanto essere pari al 95.8 % (230/240).

La **sensibilità relativa** è risultata pari al 95.5 % (21/22).

La **specificità relativa** è risultata pari al 95.9 % (209/218).

BIBLIOGRAFIA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β 2-glicoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.
7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.
8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.
9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β 2-Glicoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18, 5166-5174.

11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human β 2-glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. EMBO J 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. Lancet 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- β 2-glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. AM J Med, 1992; 93, 181-186.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italia

ITALIA

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics Srl
Via Lungo L'Emma 7 – 50012 Bagno a Ripoli - Firenze
Tel. 055 56 80 422 - Fax 055 56 80 905
www.menariniagnostics.com