



ImmuLisa™ Anti-Cardiolipin Antibody (ACA) Screen ELISA

IVD For in vitro diagnostics use

CLIA Complexity: High
 CDC Analyte Identification Code: 0434
 CDC Test System Identification Code: 28515

PRODUCT INSERT

REF 1118S Anti-Cardiolipin Antibody Screen ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunoassay (ELISA) for the detection of IgG, IgA and IgM class anticardiolipin antibodies as an aid in assessing the risk of thrombosis in individuals with anti-phospholipid syndrome.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous group of autoantibodies against negatively charged phospholipids¹. They are detected primarily by the anti-cardiolipin antibody (ACA) test, the biological false positive test for syphilis and the lupus anticoagulant test. These three tests detect related, but not necessarily identical antibodies. Thus, more than one of these tests is sometimes necessary to identify antiphospholipid antibodies.

Of the various tests for the detection of antiphospholipid antibodies, the anti-cardiolipin antibody test performed by ELISA is the most sensitive². The presence of anti-cardiolipin antibodies helps to identify patients at risk of venous and/or arterial thrombosis often accompanied by thrombocytopenia, a syndrome referred to as antiphospholipid syndrome¹⁻¹². The antiphospholipid syndrome most commonly occurs in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) or lupus-like disease where the criteria for SLE are not fulfilled⁵⁻⁷. High levels of anti-cardiolipin antibodies occur in thrombosis, fetal loss, thrombocytopenia and several other disorders¹⁻¹⁵. Low levels of anti-cardiolipin antibodies are found in a variety of clinical disorders which are unrelated to antiphospholipid syndrome. Therefore, low levels of these antibodies are of limited significance.

IgG and IgA class anti-cardiolipin antibodies appear to be more closely associated with antiphospholipid syndrome than the IgM class antibodies. However, IgM antibodies appear to be more influenced by treatment^{5,10}. Low levels of IgM antibodies can be identified in other autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, primary Sjögren's Syndrome, drug induced lupus erythematosus, Lyme disease, and syphilis^{8,10}.

The ImmuLisa™ ACA Screen ELISA offers a convenient method of screening patient sera for the presence of ACA before further identifying positive samples for individual isotypes with the ImmuLisa™ ACA-IgG, -IgA and-IgM ELISA.

PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

Cardiolipin antigen is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrator and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any cardiolipin antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. After washing away any un-bound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁶. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to en-sure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

Materials provided

ImmLISA™ Anti-Cardiolipin Antibody Screen ELISA **REF** 1118S

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

| | | |
|------------|--|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Microplate with individual breakaway microwells coated with cardiolipin antigen. |
| 1 x 1.5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Ready to use Calibrator (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to cardiolipin. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for ACA. |
| 1 x 1.5 ml | CONTROL - * | Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPHOS * | Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Ready to use Serum Diluent . Color coded blue. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light. |
| 1 x 12 ml | STOP | Ready to use Stop Solution . |
| 2 x | BUF WASH | Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each. |

* Contains < 0.1% NaN₃

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

IVD In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

EN

Materials Required But Not Provided

- Pipette capable of dispensing 5 μ l and 1000 μ l
- Disposable pipette tips
 - Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
 - Deionized or distilled water
 - Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
 - Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
 - Timer
 - Absorbent paper
- Automated microplate washer capable of dispensing 200 μ l

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

Assay procedure

1. **ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
2. Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
3. Prepare a **1:201** dilution of the patient specimen by mixing **5 μ l** of the patient specimen with **1.0 ml** of Serum Diluent.
4. Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator.

QUALITATIVE DETERMINATION



5. Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.
Note: Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank. The absorbance of this well should not be greater than 0.3.
6. Incubate **30 minutes** (± 5 minutes) at room temperature on a level surface.
7. Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
8. Add 1 00µL of the Conjugate to each well.
9. Incubate the wells for **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
10. Wash step: Repeat step 7.
11. Add 100µL of En yme Substrate to each well.
12. Incubate for **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
13. Add 1 00µL of Stop Solution to each well. Maintain the same se uence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
14. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrator, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml.

RESULTS

Calculations

The following method should be used to determine whether the specimen is positive or negative for ACA.

QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator}} \times \text{EU/ml of Calibrator} = \text{EU/ml Test Sample}$$

Interpretation

The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

| ACA Screen Value | Interpretation |
|------------------|----------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Borderline |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

The literature suggests that, low positive anti-cardiolipin antibody levels may occur in a variety of clinical disorders unrelated to antiphospholipid antibody syndrome. Hence according to the investigators recommendations the diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome should be made only when the test results are moderately or highly positive¹⁴.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A diagnosis cannot be made on the basis of ACA results alone. The results of other laboratory tests and clinical findings must be considered. Tests for rheumatoid factor (RF) should be performed because RF may interfere with this assay. When a negative ACA test occurs in the presence of clinical indications, a lupus anticoagulant test or other additional testing is indicated. ACA also occur transiently in a variety of infectious diseases. In these cases patients positive for ACA should be retested following an appropriate interval. Confirmed active or seropositive syphilis patients can have elevated ACA levels. To rule out syphilis, confirmatory tests should be performed.

EXPECTED VALUES

The incidence of ACA in various disease conditions is summarized in the following tables:

Incidence of ACA in SLE^{15,17}

| Antibody Isotype | % Incidence |
|------------------|-------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Any isotype | 53 |

Disease Association of ACA

| Condition | % Incidence |
|-----------------------------|-------------|
| Recurrent Venous Thrombosis | 28-71 |
| Recurrent Fetal Loss | 28-64 |
| Transverse Myelitis | 50 |
| Hemolytic Anemia | 38 |
| Thrombocytopenia | 27-33 |
| Arterial Occlusions | 25-31 |
| Livedo Reticularis | 25 |
| Pulmonary Hypertension | 20-40 |

PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Comparison of ELISA Methods for the Detection of ACA**

| | | Immco™ IgG-ACA | | |
|-------------|---------|----------------|---------|---------|
| | | POS (+) | NEG (-) | TOT (=) |
| ImmuLisa™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 |
| TOT (=) | | 33 | 42 | 75 |

relative specificity: 95.5%
 relative sensitivity: 100.0%
 relative agreement: 97.3%

Precision:

Two samples with known concentrations of ACA were assayed in 10 replicates over a period of two weeks. Intra- and inter-assay coefficient of variation (CV) were as follows:

| | Intra- plate CV | Inter-plate CV |
|----|--------------------|-------------------|
| 1. | 7.6% | 5.9% |
| 2. | 10.4% | 6.3% |

Recovery:

Samples with known concentrations of ACA were mixed with the appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of ACA. The ACA values of the spiked samples were then determined and from the values obtained the percent recovery calculated.

| | ACA added | ACA obtained | % Recovery |
|----|-----------|--------------|------------|
| 1. | 127.0 | 135.8 | 106.9 |
| 2. | 103.8 | 103.2 | 99.4 |
| 3. | 64.3 | 61.2 | 95.2 |



ImmuLisa™ Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης (ACA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1118S έθοδος SA διαλογής για αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης (A A) 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση αντισωμάτων τάξης IgG, IgA και IgM κατά της καρδιολιπίνης, ως βοήθημα στην αξιολόγηση του κινδύνου θρόμβωσης σε άτομα με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι μια ετερογενής ομάδα αυτοαντισωμάτων κατά αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων¹. Ανιχνεύονται κυρίως την ανάλυση αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης (ACA), τη βιολογικά ψευδώς θετική ανάλυση για σύφιλη και τη δοκιμασία για το αντιπηκτικό του λύκου. Αυτές οι τρεις αναλύσεις ανιχνεύουν σχετιζόμενα, αλλά όχι απαραίτητα πανομοιότυπα αντισώματα. Συνεπώς, μερικές φορές απαιτούνται περισσότερες από μία από αυτές τις αναλύσεις για να αναγνωριστούν τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα.

Από τις διάφορες αναλύσεις για την ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, η ανάλυση αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης που εκτελείται με ELISA είναι η πιο ευαίσθητη². Η παρουσία αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης συμβάλλει στην αναγνώριση ασθενών με κίνδυνο φλεβικής και/ή αρτηριακής θρόμβωσης, οι οποίες συχνά συνοδεύονται από θρομβοκυτταροπενία, ενός συνδρόμου που αναφέρεται ως αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο¹⁻¹². Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) ή παθήσεις παρόμοιες με λύκο στις οποίες δεν πληρούνται τα κριτήρια του ΣΕΛ⁵⁻⁷. Υψηλά επίπεδα αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης εμφανίζονται στη θρόμβωση, στην αποβολή εμβρύου, στη θρομβοκυτταροπενία και αρκετές άλλες διαταραχές¹⁻¹⁵. Χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης εμφανίζονται σε διάφορες κλινικές διαταραχές οι οποίες δεν σχετίζονται με το σύνδρομο αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Συνεπώς, τα χαμηλά επίπεδα αυτών των αντισωμάτων είναι περιορισμένης σημασίας.

Τα αντισώματα τάξης IgG και IgA κατά της καρδιολιπίνης φαίνεται να σχετίζονται πιο στενά με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο από ότι τα αντισώματα τάξης IgM. Ωστόσο, τα IgM αντισώματα φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από τη θεραπευτική αγωγή^{5,10}. Χαμηλά επίπεδα IgM αντισωμάτων μπορούν να αναγνωριστούν σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren, ο επαγόμενος από φάρμακα ερυθηματώδης λύκο, η νόσος Lyme και η σύφιλη^{8,10}.

Η μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα ACA ImmuLisa™ προσφέρει μια εύκολη μέθοδο διαλογής των ορών ασθενών για την παρουσία αντισωμάτων ACA, πριν από την περαιτέρω αναγνώριση των διαφόρων υποτύπων των θετικών δειγμάτων με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα ACA-IgG, -IgA και -IgM ImmuLisa™.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το αντιγόνο της καρδιολιπίνης δεσμεύεται στις κυψελίδες ενός πλακιδίου μικροκυψελίδων από πολυστυρένιο και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν παρουσίασαν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, ο βαθμονομητής και οι αραιωμένοι οροί των ασθενών προστίθενται σε ξεχωριστές κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των υπαρχόντων αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης στο καθηλωμένο αντιγόνο. Το δείγμα που δεν δεσμεύτηκε εκπλένεται και προστίθεται σε κάθε κυψελίδα ένα σημασμένο με ένζυμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη της αντίστοιχης τάξης. Αφού εκπλυθούν τα τυχόν μη δεσμευμένα συζευκτικά αντισώματα, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP). Μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης, η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, μετράται με φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή αποιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁵. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εφάνίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και χημικής μόλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA διαλογής για αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης (ACA) Immco™ **REF** 1118S

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

| | | |
|------------|--|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο καρδιολιπίνης. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Έτοιμος προς χρήση Βαθ ονο ητής (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα ACA. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPHOS * | Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε. |

EL

| | | |
|-----------|------------------------|---|
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως. |
| 1 x 12 ml | STOP | Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερασίου . |
| 2 x | BUF WASH | Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα. |

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Απαιτού υλικά που δεν παρέχονται

Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl

Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών

Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων

Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό

Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Χρονομετρητής

Απορροφητικό χαρτί

Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.

Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.

- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν ηχηρή οπτική ένδειξη στα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**

Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση της αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**

Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.

Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σημάνετε το αρχείο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:201**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **1,0 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
4. Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη, στο ψυγείο.

Ποιοτικός προσδιορισμός

| | | | | |
|---|-------|-----|---|---|
| A | BLANK | S5 | | |
| B | NEG | S6 | | |
| C | POS | S7 | | |
| D | CAL | S8 | | |
| E | S1 | S9 | | |
| F | S2 | S10 | | |
| G | S3 | S11 | | |
| H | S4 | S12 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |

5. Προσθέστε **100 μl** βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Η απορρόφηση αυτής της κυψελίδας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3.
6. Επωάστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναρροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300 μ L του **αναυσοσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναρροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιηθεί ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε ένα απορροφητικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.
8. Προσθέστε 100 μ L συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.
9. Επωάστε τις κυψελίδες επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Στάδιο έκπλυσης: Επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 μ L ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επωάστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθέστε 100 μ L διαλύματος τερματισμού σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τερματισμού, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μιας ώρας από τον τερματισμό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι <0,3. Ο βαθμονομητής πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**Υπολογισ οί**

Για να καθορίσετε εάν το δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό για ACA θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε την παρακάτω μέθοδο.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

$$\frac{\text{Απ/ση εξεταζό ενου δείγ ατος}}{\text{Απ/ση του Βαθ ονο ητή}} \times \text{EU/ I του βαθ ονο ητή} = \text{EU/ I εξεταζό ενου δείγ ατος}$$

Ερ ηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

| Τι ή ACA διαλογής | Ερ ηνεία/ |
|--------------------------|------------------|
| <20 EU/ml | Αρνητικό (-) |
| 20-25 EU/ml | Οριακό |
| >25 EU/ml | Θετικό (+) |

Από τη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ελαφρώς θετικά επίπεδα αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης ενδέχεται να εμφανιστούν σε διάφορες κλινικές διαταραχές οι οποίες δεν σχετίζονται με το σύνδρομο αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων. Συνεπώς, σύμφωνα με τις συστάσεις των ερευνητών, η διάγνωση συνδρόμου αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων θα πρέπει να τίθεται μόνο όταν τα αποτελέσματα των εξετάσεων είναι μετρίως ή πολύ υψηλά¹⁴.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η διάγνωση δεν μπορεί να τεθεί μόνο με τα αποτελέσματα των αντισωμάτων ACA. Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα και άλλων εργαστηριακών εξετάσεων, καθώς και τα κλινικά ευρήματα. Θα πρέπει να διενεργηθούν εξετάσεις για ρευματοειδή παράγοντα (ΡΠ), καθώς ο ΡΠ ενδέχεται να επηρεάσει αυτή την ανάλυση. Όταν εμφανίζεται αρνητικό αποτέλεσμα στην ανάλυση ACA παρουσία κλινικών ενδείξεων, ενδείκνυται η διενέργεια μιας ανάλυσης για το αντιπηκτικό του λύκου ή κάποιας άλλης πρόσθετης ανάλυσης. Αντισώματα ACA εμφανίζονται επίσης περιστασιακά σε διάφορα λοιμώδη νοσήματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ασθενείς που εμφανίζονται θετικοί για ACA θα πρέπει να ελέγχονται εκ νέου μετά την πάροδο ενός εύλογου χρονικού διαστήματος. Ασθενείς με επιβεβαιωμένη ενεργό σύφιλη ή οροθετικοί για σύφιλη μπορούν επίσης να εμφανίσουν αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων ACA. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο σύφιλης, θα πρέπει να εκτελεστούν εξετάσεις επιβεβαίωσης.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων ACA σε διάφορες παθήσεις συνοψίζεται στους παρακάτω πίνακες:

Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων ACA στο ΣΕΛ^{15,17}

| Ισότυπος αντισώ ατος | % Συχνότητα ε φάνισης |
|-----------------------------|------------------------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Οποιοσδήποτε ισότυπος | 53 |

EL

Συσχέτιση αντισωμάτων ACA με παθήσεις

| Κατάσταση | % Συχνότητα εμφάνισης |
|---------------------------------|-----------------------|
| Υποτροπιάζουσα φλεβική θρόμβωση | 28-71 |
| Καθ' έξιν αποβολές | 28-64 |
| Εγκάρσια μυελίτιδα | 50 |
| Αιμολυτική αναιμία | 38 |
| Θρομβοκυτταροπενία | 27-33 |
| Αποφράξεις αρτηριών | 25-31 |
| Δικτυωτή πελίωση | 25 |
| Πνευμονική υπέρταση | 20-40 |

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Σύγκριση των μεθόδων ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων ACA

| | | Immco™ IgG-ACA | | |
|-------------|--------------|----------------|--------------|------------|
| | | Θετικά (+) | Αρνητικά (-) | Σύνολο (=) |
| ImmuliLisa™ | Θετικά (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | Αρνητικά (-) | 2 | 42 | 44 |
| | Σύνολο (=) | 33 | 42 | 75 |

σχετική ειδικότητα: 95,5%
σχετική ευαισθησία: 100,0%
σχετική συμφωνία: 97,3%

Ακρίβεια:

Αναλύθηκαν δύο δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων ACA σε 10 αντίγραφα σε μια περίοδο δύο εβδομάδων. Οι τιμές των συντελεστών ποικιλότητας (CV) εντός σειράς και μεταξύ σειρών ήταν οι ακόλουθες:

| | Εντός πλακιδίου CV | Μεταξύ πλακιδίων CV |
|----|-----------------------|------------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων ACA αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων ACA. Προσδιορίστηκαν οι τιμές των αντισωμάτων ACA των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση.

| | ACA που προστέθηκε | ACA που λήφθηκε | Ανάκτηση % |
|----|-----------------------|--------------------|------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |



ImmuLisa™ Detección de anticuerpos anticardiolipina (ACA) ELISA Screen

IVD

PROSPECTO

REF 1118S ELISA Screen anticuerpos anti-cardiolipina 96 análisis

USO PREVISTO

Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para detección de anticuerpos anticardiolipina de clase IgG, IgA y IgM, como herramienta para evaluar el riesgo de trombosis en individuos con síndrome antifosfolípido.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antifosfolípido son un grupo heterogéneo de auto anticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa¹. Los métodos fundamentales de detección son el ensayo de anticuerpos anticardiolipina (ACA), el análisis biológico falsamente positivo de sífilis y el ensayo de lupus anticoagulante. Estos tres análisis detectan anticuerpos emparentados pero no necesariamente idénticos, razón por la que a veces es necesario efectuar más de uno de estos ensayos para identificar los anticuerpos antifosfolípido.

De los diferentes análisis para detectar anticuerpos antifosfolípido, el más sensible es el de anticuerpos anticardiolipina efectuado mediante ELISA². La presencia de anticuerpos anticardiolipina es una herramienta eficaz para identificar a pacientes con riesgo de trombosis venosa o arterial, frecuentemente acompañada de trombocitopenia, denominada síndrome antifosfolípido¹⁻¹². Este síndrome se presenta con mayor frecuencia en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o patologías similares al lupus que no cumplen con los criterios del LES⁵⁻⁷. Niveles elevados de anticuerpos anticardiolipina se registran en trombosis, pérdida del feto y otras patologías¹⁻¹⁵. Niveles bajos de anticuerpos anticardiolipina se encuentran en una serie de trastornos clínicos que no están relacionados con el síndrome antifosfolípido de todos modos, niveles bajos de estos anticuerpos tienen una importancia limitada.

Los anticuerpos anticardiolipina de clase IgG e IgA parecen estar más estrechamente relacionados con el síndrome antifosfolípido que los de clase IgM. Sin embargo, los anticuerpos IgM parecen responder mejor al tratamiento^{5,10}. También en otras patologías autoinmunes se encuentran niveles bajos de anticuerpos IgM: artritis reumatoide, síndrome primario de Sjögren, lupus eritematoso inducido por drogas, enfermedad de Lyme y sífilis^{8,10}.

El ensayo Elisa Screen ACA ImmuLisa™ ofrece un método eficaz de detectar ACA en el suero del paciente antes de someter las muestras positivas a la determinación de isotipos individuales mediante los análisis ELISA ACA-IgG, -IgA and y IgM ImmuLisa™.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno cardiolipina se une a los pocillos de una placa de poliestireno a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Controles, calibradores y muestra diluida de suero del paciente se añaden a pocillos separados, permitiendo que los anticuerpos cardiolipina presentes se unan al antígeno inmovilizado. Las muestras no unidas se eliminan mediante lavado a cada pocillo se añade un conjugado anti-humano marcado con un enzima. Este conjugado se une específicamente a la inmunoglobulina humana de su correspondiente clase. El conjugado no unido se elimina mediante lavado y a continuación se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). Se detiene la reacción enzimática y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo, mediante un espectrofotómetro 405 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.**

No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C).

ES

Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Conservado a 2-8°C, el tiempo de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tiempo de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respete las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹⁶. ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar la validez de los resultados, asegurese de que el kit sea el correcto y que no haya sido usado anteriormente en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA Screen para anticuerpos anticardiolipina ImmuLisa™ **REF** 1118S

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

| | | |
|------------|--|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno cardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Calibrador listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anticardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Control positivo listo para usar (<i>tapa verde</i>). Contiene suero humano positivo a ACA. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPPOS * | Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Diluyente de suero listo para usar. Color azul. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protección a la luz. |
| 1 x 12 ml | STOP | Solución Stop lista para usar. |
| 2 x | BUF WASH | Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro. |







* Contiene < 0.1% NaN₃

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

ES

-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl

- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Temporizador
- Papel absorbente

Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- **Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice; ciérrelo herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua.**
- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

ES

Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio efectuar los ensayos de muestras por duplicado.
3. Prepare una dilución de **1:201** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **1,0 ml** de diluyente de suero.
4. Coja los pocillos necesarios del sobre, ciérrelo bien y póngalo nuevamente en la nevera de inmediato.



5. Añada **100 µl** de calibradores, control positivo y negativo y muestras diluidas del paciente a los pocillos indicados en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo. La absorbancia de este pocillo no debe ser superior a 0,3.
6. Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Lavado: aspire completamente el contenido de cada pocillo. Añada 200-300µl de tampón de lavado reconstituido a todos los pocillos y aspire. Repita tres veces hasta completar cuatro lavados. Invierta la placa sobre papel absorbente y sacúdala para eliminar todo resto de líquido después del lavado. No seque del todo los pocillos.
8. Añada 100µl de conjugado a cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
10. Lavado: proceda como en el punto 7.
11. Añada 100µl de substrato enzimático a cada pocillo.
12. Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
13. Añada 100µl de solución Stop a cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora después de haber detenido la reacción.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del calibrador no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml.

ES

RESULTADOS

Cálculo

Para determinar si una muestra es positiva o negativa a ACA puede utilizarse el siguiente método.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

$$\frac{\text{Abs. de muestra analizada}}{\text{Abs. del calibrador}} \times \text{EU/ml del calibrador} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Abs. del calibrador

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

| Valor Screen ACA | Interpretación |
|------------------|-----------------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Incierto (Borderline) |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

La literatura específica indica que en diferentes trastornos clínicos no relacionados con el síndrome de anticuerpo antifosfolípido pueden presentarse valores bajos de anticuerpos anticardiolipina. Siguiendo las sugerencias de los investigadores, se debe diagnosticar el síndrome de anticuerpo antifosfolípido solamente en aquellos casos en que los resultados del análisis sean moderada o fuertemente positivos¹⁴.

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico no debe basarse solamente en el resultado del análisis de ACA, sino que se han de ponderar los resultados de otros análisis de laboratorio y los aspectos clínicos. Se debe efectuar el análisis del factor reumatoide porque el FR puede interferir con este ensayo. Cuando el ensayo ACA resulta negativo en presencia de indicaciones clínicas, es aconsejable efectuar un análisis de lupus anticoagulante u otro análisis adicional. También pueden encontrarse ACA transitoriamente en una serie de enfermedades infecciosas. En estos casos, será necesario volver a efectuar el análisis ACA después de un tiempo prudencial. Los pacientes con sífilis evidente o seropositivos pueden presentar niveles altos de ACA; para descartar la sífilis son necesarios análisis de confirmación.

VALORES ESPERADOS

La incidencia de ACA en varias patologías se resume en las siguientes tablas:

Incidencia de ACA en LES ^{15,17}

| Isotipo de anticuerpo | % Incidencia |
|-----------------------|--------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Cualquier isotipo | 53 |

ES

Asociación de ACA con la dolencia

| Condición | % Incidencia |
|-----------------------------|---------------------|
| Trombosis venosa recurrente | 28-71 |
| Pérdida del feto recurrente | 28-64 |
| Mielitis transversal | 50 |
| Anemia hemolítica | 38 |
| Trombocitopenia | 27-33 |
| Oclusiones arteriales | 25-31 |
| Livedo reticularis | 25 |
| Hipertensión pulmonar | 20-40 |

CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN

Comparación de métodos ELISA para detección de ACA

| | | Immco™ IgG-ACA | | |
|--------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| | | POS (+) | NEG (-) | TOT (=) |
| ImmuliSia™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 |
| TOT (=) | | 33 | 42 | 75 |

especificidad relativa: 95,5%
sensibilidad relativa: 100,0%
correspondencia relativa: 97,3%

Precisión:

Se analizaron por diez veces dos muestras con concentración conocida de ACA a lo largo de dos semanas. Los coeficientes de variación (CV) intra y entre ensayo son los siguientes:

| | Intra- placa CV | Inter-placa CV |
|----|----------------------------|---------------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Recuperación:

Muestras con concentración conocida de ACA se mezclaron con la dilución adecuada de otra muestra positiva con cantidad conocida de ACA. Se determinaron los niveles de ACA en las muestras mezcladas y se calculó el porcentaje de recuperación a partir de los valores obtenidos.

| | ACA a adido | ACA obtenido | % Recuperación |
|----|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |



IMMCO
DIAGNOSTICS

ImmuLisa™ Anti-Cardiolipin-Antikörper-ELISA-Screeningtest (ACA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1118S Anti-Cardiolipin-ELISA-Screeningtest 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis von Anti-Cardiolipin-Antikörpern der Klassen IgG, IgA und IgM als Hilfsmittel für die Bewertung des Thromboserisikos bei Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Anti-Phospholipid-Antikörper sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern gegen negativ geladene Phospholipide¹. Sie werden hauptsächlich mit Hilfe des Anti-Cardiolipin-Antikörpertests (ACA), des biologischen falsch positiven Syphilitests und des Lupus-Antikoagulan-Tests nachgewiesen. Diese drei Tests weisen verwandte, aber nicht unbedingt identische Antikörper nach. Daher ist manchmal mehr als einer dieser Test erforderlich, um Anti-Phospholipid-Antikörper zu identifizieren.

Unter den verschiedenen Tests für den Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern hat der mit der ELISA-Methode durchgeführte Anti-Cardiolipin-Antikörpertest die größte Sensitivität². Das Vorhandensein von Anti-Cardiolipin-Antikörpern hilft dabei, Patienten zu identifizieren, bei denen die Gefahr einer venösen und/oder arteriellen Thrombose, oftmals begleitet von einer Thrombozytopenie, besteht; dieses Syndrom wird als Antiphospholipid-Syndrom bezeichnet¹⁻¹². Es tritt am häufigsten bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) oder mit Lupus-ähnlichen Krankheiten, bei denen die SLE-Kriterien nicht erfüllt sind, auf⁵⁻⁷. Ein hoher Spiegel von Anti-Cardiolipin-Antikörpern tritt bei Thrombose, Fehlgeburten, Thrombozytopenie und mehreren anderen Krankheiten auf¹⁻¹⁵. Niedrige Spiegel von Anti-Cardiolipin-Antikörpern sind bei einer Reihe von klinischen Krankheiten zu finden, die nicht mit dem Antiphospholipid-Syndrom in Verbindung stehen. Niedrige Spiegel dieser Antikörper haben daher eine eingeschränkte Bedeutung.

Anti-Cardiolipin-Antikörper der Klassen IgG und IgA scheinen enger mit dem Antiphospholipid-Syndrom verbunden zu sein als die Antikörper der Klasse IgM. IgM-Antikörper scheinen jedoch eher durch eine Behandlung beeinflusst zu werden^{5,10}. Niedrige Konzentrationen von IgM-Antikörpern können bei anderen Autoimmunkrankheiten identifiziert werden, darunter rheumatoide Arthritis, primäres Sjögren-Syndrom, arzneimittelinduzierter Lupus erythematoses, Borreliose und Syphilis^{8,10}.

Der ImmuLisa™ ACA-ELISA-Screeningtest stellt eine praktische Methode dar, mit der Patientenseren auf das Vorhandensein von ACA untersucht werden können, bevor bei positiven Proben mit dem ImmuLisa™ ACA-IgG-, -IgA- und -IgM-ELISA die einzelnen Isotypen identifiziert werden.

TESTPRINZIP

Cardiolipin-Antigen wird an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, der Kalibrator und verdünnte Patientenseren werden in separate Vertiefungen gegeben; dies ermöglicht die Bindung der eventuell vorhandenen Cardiolipin-Antikörper an das immobilisierte Antigen. Ungebundene Proben werden durch Waschen entfernt, und jeder Vertiefung wird ein enzymmarkiertes Anti-human-Konjugat hinzugefügt. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das menschliche Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nachdem eventuell nicht gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt wurde, wird den Vertiefungen ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) hinzugefügt. Nachdem die enzymatische Reaktion gestoppt wurde, wird die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

DE

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁶.

WARNUNG Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metalazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anheftung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Anti-Cardiolipin-ELISA-Screeningtest **REF** 1118S

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

| | | |
|------------|--|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit Cardiolipin-Antigen beschichtet |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Gebrauchsfertiger Kalibrator (<i>grüneappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Cardiolipin. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>roteappe</i>). Enthält ACA-positives Humanserum. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weißeappe</i>). Enthält Humanserum. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPHOS * | Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen. |
| 1 x 12 ml | STOP | Gebrauchsfertige Stopplösung . |
| 2 x | BUF WASH | Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren. |

* Enthält < 0,1% NaN_3


DE

Auf den Etiketten verwendete Symbole:


 Chargennummer

 Bestellnummer


 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

 In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hemmolytierte, lipemische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschrift– Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeiträume beginnen nach der Verteilung der Reagenzien.

DE

Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN.**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:201**, indem Sie **5 µl** der Patientenprobe mit **1,0 ml** Probenverdünnung vermischen.
4. Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank.

QUALITATIVE BESTIMMUNG

| | | | | |
|---|-------|-----|---|---|
| A | BLANK | S5 | | |
| B | NEG | S6 | | |
| C | POS | S7 | | |
| D | CAL | S8 | | |
| E | S1 | S9 | | |
| F | S2 | S10 | | |
| G | S3 | S11 | | |
| H | S4 | S12 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |

5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünnung als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null. Die Extinktion dieser Vertiefung sollte nicht über 0,3 liegen.
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.
7. Waschschrift: Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 200-300 µL des **rekonstituierten** Waschpuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte noch dreimal, bis Sie insgesamt viermal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.
8. Geben Sie 100 µL Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen **30 Minuten** (± 5 min) lang bei Raumtemperatur.
10. Waschschrift–Wiederholen Sie Schritt 7.
11. Geben Sie 100 µL Enz ymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 min) lang bei Raumtemperatur.
13. Geben Sie 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung. Beachten Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enz ymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer oder zwei Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

DE

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen der Kalibrator, die positiven und negativen Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Der Kalibrator sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die EU/ml zu bestimmen.

ERGEBNISSE Berechnungen

Die folgende Methode sollte verwendet werden, um zu bestimmen, ob die Probe ACA-positiv oder ACA-negativ ist.

QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

_____ X EU/ml von Kalibrator = EU/ml der Testprobe

Ext. von Kalibrator

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

| ACA-Screening-Wert | Interpretation |
|--------------------|----------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Grenzbereich |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

Aus der Literatur geht hervor, dass niedrige positive Konzentrationen von Anti-Cardiolipin-Antikörpern bei einer Reihe von klinischen Krankheiten, die nicht mit dem Antiphospholipid-Syndrom in Verbindung stehen, auftreten können. Die Forscher empfehlen daher, ein Antiphospholipid-Syndrom nur dann zu diagnostizieren, wenn die Ergebnisse mittelmäßig bis stark positiv sind¹⁴.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Eine Diagnose kann nicht allein aufgrund der ACA-Ergebnisse gestellt werden. Die Ergebnisse anderer Labortests und die klinischen Befunde müssen berücksichtigt werden. Ein Test auf Rheumafaktoren (RF) sollte durchgeführt werden, da RF diesen Test beeinträchtigen können. Wenn ein ACA-Test negativ ausfällt, obwohl klinische Anzeichen vorhanden sind, sind ein Lupus-Antikoagulanz-Test oder andere zusätzliche Tests angezeigt. ACA treten auch vorübergehend bei einer Reihe von Infektionskrankheiten auf. In solchen Fällen sollten ACA-positive Patienten nach Ablauf eines angemessenen Zeitraums erneut getestet werden. Patienten mit bestätigter aktiver oder seropositiver Syphilis können hohe ACA-Spiegel aufweisen. Bestätigungstests sollten durchgeführt werden, um Syphilis auszuschließen.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von ACA bei verschiedenen Erkrankungen wird in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Häufigkeit von ACA bei SLE^{15,17}

| Antikörper-Isotyp | % Häufigkeit |
|-------------------|--------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| beliebiger Isotyp | 53 |

DE

Krankheitszusammenhang von ACA

| Krankheit | % Häufigkeit |
|----------------------------|--------------|
| Wiederholte Venenthrombose | 28-71 |
| Wiederholte Fehlgeburten | 28-64 |
| Querschnittsmyelitis | 50 |
| Hämolytische Anämie | 38 |
| Thrombozytopenie | 27-33 |
| Arterienverschluss | 25-31 |
| Livedo Reticularis | 25 |
| Lungenhochdruck | 20-40 |

LEISTUNGSMERKMALE

Vergleich von ELISA-Methoden für den Nachweis von ACA

| | | Immco™ IgG-ACA | | | |
|-------------|---------|----------------|---------|------------|----|
| | | POS (+) | NEG (-) | GESAMT (=) | |
| ImmuLisa™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 | |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 | |
| | | GESAMT (=) | 33 | 42 | 75 |

relative Spezifität: 95,5%
relative Sensitivität: 100,0%
relative Übereinstimmung: 97,3%

Genauigkeit:

Zwei Proben mit bekannten ACA-Konzentrationen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg zehnmal getestet. Die intraseriellen und interseriellen Variationskoeffizienten (VK) sind nachfolgend angezeigt:

| | Intraserieller VK | Interserieller VK |
|----|----------------------|----------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Wiederfindung:

Proben mit bekannten ACA-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an ACA gemischt. Die ACA-Werte der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet.

| | ACA zugef. µg | ACA gemessen | % Wiederfindung |
|----|------------------|-----------------|--------------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |



ImmuLisa™ D pistage ELISA par anticorps anti-cardiolipine (ACA)

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1118S ACA Screen ELISA 96 Tests

UTILISATION PRÉVUE

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, destinée à la détection des anticorps anti-cardiolipine IgG, IgA et IgM, servant de support dans l'évaluation du risque de thrombose chez des individus souffrant du syndrome anti-phospholipide.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps antiphospholipides sont un groupe hétérogène d'auto-anticorps contre les phospholipides négativement chargés¹. Ils sont essentiellement détectés par le test anticorps anti-cardiolipine (ACA), le faux positif biologique pour la syphilis ou le test du lupus anticoagulant. Ces trois tests détectent des anticorps apparentés, mais non nécessairement identiques. Par conséquent, plus d'un de ces tests peut s'avérer nécessaire pour identifier les anticorps antiphospholipides.

Des différents tests servant à la détection d'anticorps antiphospholipides, le test de l'anticorps anti-cardiolipine réalisé par ELISA est le plus sensible². La présence d'anticorps anti-cardiolipine permet d'identifier des patients exposés à des risques de thrombose veineuse et/ou artérielle, souvent accompagnée de thrombocytopenie, un syndrome connu sous le nom de syndrome des antiphospholipides¹⁻¹². Il se produit le plus communément chez les patients présentant un lupus érythémateux systémique (SLE) ou des maladies à effet lupus pour lesquels les critères de SLE ne sont pas réunis⁵⁻⁷. Des niveaux élevés d'anticorps anti-cardiolipine se manifestent dans la thrombose, la mortalité embryonnaire, la thrombocytopenie et plusieurs autres maladies¹⁻¹⁵. De bas niveaux d'anticorps anti-cardiolipine sont décelés dans une vaste gamme de maladies cliniques qui ne sont pas liées avec le syndrome antiphospholipide. Par conséquent, de faibles niveaux de ces anticorps ne présentent qu'une signification limitée.

Les anticorps anti-cardiolipine de la classe IgG et IgA apparaissent plus étroitement liés au syndrome antiphospholipide que les autres anticorps de la classe IgM. Cependant, les anticorps IgM apparaissent être davantage influencés par le traitement^{5,10}. On peut constater de bas niveaux d'anticorps IgM dans d'autres maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren primaire, le lupus érythémateux provoqués par des médicaments, la maladie de Lyme et la syphilis^{8,10}.

Le dépistage des anticorps anti-cardiolipine par méthode ELISA ImmuLisa™ représente une méthode pratique d'analyse du sérum de patient à la recherche des anticorps ACA avant l'identification ultérieure des échantillons positifs pour les isotypes individuels avec la méthode ELISA ImmuLisa™ ACA-IgG, -IgA et -IgM.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

L'antigène cardiolipine est lié aux puits d'une plaque de puits en polystyrène, suivi d'un blocage des sites sans réaction afin de limiter l'agglutination non spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et le sérum dilué du patient sont ajoutés aux puits séparés, en permettant aux anticorps anti-cardiolipine présents de se lier à l'antigène immobilisé. L'échantillon non lié est éliminé par lavage et un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique humain est ajouté à chaque puits. Ces anticorps conjugués à une enzyme se lient de manière spécifique à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après avoir éliminé par lavage tout le conjugué lié, un substrat spécifique (pNPP- paranitrophénylphosphate) est ajouté aux puits. Après l'arrêt de la réaction enzymatique, l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU)/ml.

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité

FR

est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant l'usage. Quand elle est entreposée à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de l'équipement. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Pr cautions

Destiné à un usage diagnostique in vitro. Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours des opérations de stockage, de distribution et de manipulation de ce matériel¹⁶. **AVERTISSEMENT** L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue Immco Diagnostics Inc.

Il faut avoir recours à de bonnes techniques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser après l'expiration de la date de péremption.

Matériel fourni

Immula™ ACA Screen ELISA [REF] 1118S

Le kit contient des réactifs qui sont suffisants pour exécuter 96 tests

| | | |
|------------|----------------------------------|--|
| 12 x 8 | [MICROPLATE] [ACA] | Microplaques avec micropuits individuels séparables enduits d'antigène cardiopiline. |
| 1 x 1,5 ml | [CALIBRATOR] [ACA SCREEN] * | Calibreur prêt à l'emploi (<i>couvercle vert</i>). Sérum humain contenant des anticorps à la cardiopiline |
| 1 x 1,5 ml | [CONTROL +] [ACA SCREEN] * | Régulateur positif prêt à l'emploi (<i>couvercle rouge</i>). Contient du sérum humain positif pour les anticorps anti-cardiopiline ACA. |
| 1 x 1,5 ml | [CONTROL -] * | Régulateur négatif prêt à l'emploi (<i>couvercle blanc</i>). Contient du sérum humain. |
| 1 x 12 ml | [IgA/IgG/IgM - CONJ] [ALKPHOS] * | Conjugué Phos. Alc. humain prêt à l'emploi. Codé en couleur rose. |
| 2 x 60 ml | [DIL] * | Diluant de sérum prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue. |
| 1 x 12 ml | [SUBSTRATE] * | Substrat d'enzyme prêt à l'emploi. Contient du pNPP. |
| 1 x 12 ml | [STOP] | Conservateur à l'abri de la lumière |
| 2 x | [BUF] [WASH] | Solution d'arrêt prête à l'emploi. |
| | | Poudre Wash Buffer (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun |

* Contient < 0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

[LOT] Numéro de lot

FR

 Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

 Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Eau distillée ou désionisée
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire les présentes instructions avec soin.
- Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes. Remettre le sachet dans le réfrigérateur immédiatement après son utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les bandes inutilisées dans le sachet contenant des produits dessiccateurs et sceller avec soin pour limiter le plus possible l'exposition à la vapeur d'eau.**
- Étape du lavage: Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. **On conseille de recourir un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- Un chronométrage soigneux est important. Les périodes d'incubation commencent après avoir dispensé les réactifs.

Procédure d'essai

1. **TOUS LES RÉACTIFS DOIVENT ÊTRE AMENÉS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT USAGE.**

FR

- Étiqueter le feuillet du protocole pour indiquer l'emplacement du spécimen dans la microplaque. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
- Préparer une dilution **1 :201** d'échantillon patient en mélangeant **5 µl** d'échantillon patient avec **1,0 ml** de diluant de sérum.
- Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur.

DÉTERMINATION QUALITATIVE

| | | | | |
|---|-------|-----|---|---|
| A | BLANK | S5 | | |
| B | NEG | S6 | | |
| C | POS | S7 | | |
| D | CAL | S8 | | |
| E | S1 | S9 | | |
| F | S2 | S10 | | |
| G | S3 | S11 | | |
| H | S4 | S12 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |

- Ajouter **100 µl** de calibres, les régulateurs positif et négatif et les échantillons de patient dilués dans les micropuits appropriés indiqués dans le dossier du protocole.
Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** de diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc. L'absorption de ce puits ne doit pas être supérieure à 0,3.
- Incuber **30 minutes** (\pm 5 minutes) à température ambiante sur une surface à niveau.
- tape du lavage: Aspirer soigneusement le contenu de chaque puits. Ajouter 200-300 L de la solution de lavage **reconstituée** aux puits et ensuite aspirer. Répéter cette séquence trois fois pour un total de quatre lavages. Renverser la plaque et la tapoter sur un matériau absorbant pour enlever tout le fluide résiduel après le dernier lavage. Ne pas sécher complètement les puits.
- Ajouter 1 00 L de conjugué à chaque puits.
- Incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.
- Étape du lavage: Recommencer l'étape 7.
- Ajouter 1 00µL de substrat d'enzyme à chaque puits.
- Incuber pendant **30 minutes** (\pm 5 min) à température ambiante.
- Ajouter 1 00 L de solution d'arrêt à chaque puits. Maintenir la même séquence et le même chronométrage pour l'addition de la solution d'arrêt que celles qui furent utilisées pour le substrat d'enzyme. Lire l'absorption (OD) de chacun puits à 405nm dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
- Lire l'absorption (OD) de chaque puits à 405nm, en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde (405/630nm) par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3 Le calibre doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml

RÉSULTATS Calculs

La méthode suivante devrait être utilisée pour déterminer si le spécimen est positif ou négatif aux anticorps ACA.

DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibreur}} \times \text{EU/ml de calibreur} = \text{EU/ml échantillon d'essai}$$

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

| Valeur dépistage ACA | Interprétation |
|----------------------|----------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Indéterminé |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

La littérature scientifique suggère que des niveaux bas d'anticorps anti-cardiolipine positifs peuvent se manifester dans le cadre de diverses maladies cliniques qui sont sans rapport avec le syndrome de l'anticorps antiphospholipide. Il en résulte que, d'après les recommandations des chercheurs, le diagnostic du syndrome de l'anticorps antiphospholipide ne devrait être posé que lorsque les résultats du test sont modérément ou hautement positifs¹⁴.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Un diagnostic ne peut être posé uniquement sur la base des résultats ACA. Il faut prendre en ligne de compte les résultats d'autres tests de laboratoire et d'autres constatations cliniques. Des tests pour le facteur rhumatoïde (RF) devraient être exécutés parce que ce facteur RF est en mesure de perturber cet essai. Quand un test négatif ACA est obtenu en présence d'indications cliniques, un test lupus anticoagulant ou un autre essai supplémentaire est recommandé. L'ACA se manifeste également dans une vaste gamme d'autres maladies infectieuses. Dans ces cas, les patients positifs aux anticorps anti-cardiolipine devraient être retestés selon un intervalle approprié. Les patients atteints de syphilis active confirmée ou séropositifs peuvent présenter des niveaux d'anticorps anti-cardiolipine élevés. Pour éliminer la syphilis, des tests de confirmation doivent être réalisés.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence des anticorps anti-cardiolipine dans différentes conditions de maladies est résumée dans le tableau suivant :

Incidence des ACA dans le Lupus érythémateux systémique^{15,17}

| Isotope anticorps | Incidence % |
|-------------------|-------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Tout isotype | 53 |

Association de maladie des ACA

| Condition | Incidence % |
|-----------------------------------|-------------|
| Thrombose veineuse récurrente | 28-71 |
| Mortalité embryonnaire récurrente | 28-64 |
| Myélite transverse | 50 |
| Anémie hémolytique | 38 |
| Thrombocytopénie | 27-33 |
| Obstructions artérielles | 25-31 |
| Livedo Reticularis | 25 |
| Hypertension pulmonaire | 20-40 |

FR

DONNÉES DE RENDEMENT

Comparaison de méthodes ELISA pour la détection des anticorps anti-cardiolipine ACA

| | | Immco™ IgG-ACA | | |
|-------------|---------|----------------|---------|---------|
| | | POS (+) | NEG (-) | TOT (=) |
| Immulin™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 |
| | TOT (=) | 33 | 42 | 75 |

spécificité relative: 95,5%
sensibilité relative: 100,0%
concordance: 97,3%

Précision :

Deux échantillons avec des concentrations connues d'ACA ont été analysés dans 10 mesures sur une période de deux semaines. Les coefficients de variation Intra - et inter-essai (CV) étaient les suivants :

| | Intra-plaque CV | Inter-plaque CV |
|----|--------------------|--------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Récupération :

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps anti-cardiolipine ACA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps de type ACA. Les valeurs ACA des échantillons étudiés en solution ont été déterminées et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues.

| | ACA supplémentaire | ACA obtenu | % Rétablissement |
|----|--------------------|------------|------------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |



ImmuLisa™ Anticorpi Anti-cardiolipina (ACA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1118S Anticorpi Anti-Cardiolipina ELISA 96 Determina ioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione di anticorpi anti-cardiolipina di classe IgG, IgA o IgM, come aiuto nella valutazione del rischio di trombosi in individui affetti da sindrome antifosfolipidi.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli anticorpi anti-fosfolipidi sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi contro i fosfolipidi caricati negativamente¹. Vengono rilevati primariamente dal test per gli anticorpi anti-cardiolipina (ACA), il test falso positivo biologico per la sifilide e il lupus anticoagulant (LAC). Questi tre test rilevano anticorpi correlati, ma non necessariamente identici, pertanto è spesso necessario eseguire più di uno di questi test per individuare la presenza di anticorpi anti-fosfolipidi.

Dei vari test per la rilevazione degli anticorpi anti-fosfolipidi, il test per gli anticorpi anti-cardiolipina eseguito mediante il metodo ELISA è il più sensibile². La presenza degli anticorpi anti-cardiolipina aiutano ad identificare i pazienti a rischio di trombosi venosa e/o arteriosa spesso accompagnata da trombocitopenia, una sindrome conosciuta anche come sindrome antifosfolipidi¹⁻¹². La sindrome antifosfolipidi occorre con maggior frequenza in pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) o disturbi analoghi che non rientrano nei criteri per il LES⁵⁻⁷. Livelli elevati di anticorpi anti-cardiolipina si hanno in caso di trombosi, perdita fetale, trombocitopenia e in una serie di altri disturbi¹⁻¹⁵. Livelli bassi di anticorpi anti-cardiolipina si riscontrano in una varietà di patologie cliniche non collegate alla sindrome antifosfolipidi. Pertanto, i livelli bassi di questi anticorpi hanno significatività limitata.

Le classi IgG e IgA degli anticorpi anti-cardiolipina appaiono essere più strettamente associate con la sindrome antifosfolipidi rispetto agli anticorpi di classe IgM. Tuttavia, gli anticorpi IgM sembra siano maggiormente influenzati dal trattamento^{5,10}. Livelli bassi di anticorpi IgM possono essere individuati con altre patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la Sindrome di Sjögren primitiva, il lupus eritematoso indotto da farmaci, la malattia di Lyme e la sifilide^{8,10}.

Il test ACA ELISA ImmuLisa™ offre un metodo conveniente per lo screening dei sieri dei pazienti per la presenza degli ACA da eseguire prima di un'ulteriore identificazione dei campioni positivi per gli isotipi individuali da eseguire con il test ELISA ACA-IgG, -IgA e -IgM ImmuLisa™.

PRINCIPI DELLE METODICHE

L'antigene cardiolipina si lega ai pozzetti presenti su una micropiastra in polistirene; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratori e campioni diluiti del siero del paziente vengono aggiunti in pozzetti separati, ci permette agli anticorpi anti-cardiolipina presenti nel siero di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene lavato via e in ciascun pozzetto viene aggiunto un coniugato anti-IgG, IgA o IgM umane marcato con enzima. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana di classe appropriata. Successivamente alla rimozione mediante lavaggio del coniugato non legato, nei pozzetti viene aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP). La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA (EU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato

a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁶. **ATTENZIONE** L'azide sodica (NaN_3) pu reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica pu essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validit dei risultati indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo.

Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-cardiolipina ELISA ImmuLisa™ **REF** 1118S

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

| | | |
|-------------------|--|--|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene cardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Calibratore (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per ACA. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPHOS * | Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG/IgA/IgM umane pronto all'uso ; di colore rosa. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Diluyente siero pronto all'uso; di colore blu. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce. |
| 1 x 12 ml | STOP | Soluzione di Stop pronta all'uso. |
| 2 x | BUF WASH | Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno. |

* Contiene < 0,1% NaN_3






Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

IT

-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni per l'uso
-  Uso diagnostico in vitro
-  Produttore
-  Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastro.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta pi rapida e il tempo di incubazione pi uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.

Metodo del test

- TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
- Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Preparare una diluizione **1:201** del campione del paziente mescolando **5µl** di campione con **1,0 ml** di Diluente del Siero.
- Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo.



- Aggiungere **100 µl** di **Calibratore, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo.**

Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. L'assorbanza del bianco non deve essere superiore a 0,3.

- Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
- Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere 200-300 µl del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
- Aggiungere 100 µl di Coniugato in ogni pozzetto.
- Incubare i pozzetti per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
- Aggiungere 100 µl di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.
- Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Aggiungere 100 µl di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia contro il bianco impostato su assorbanza 0.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore

IT

A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore < 20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture.

RISULTATI

Calcoli

Per determinare se il campione è positivo o negativo agli ACA usare il seguente metodo:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Assorbanza del campione del test

$$\frac{\text{Assorbanza del campione del test}}{\text{Assorbanza del calibratore}} \times \text{EU/ml del Calibratore} = \text{EU/ml del Campione del Test}$$

Assorbanza del calibratore

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

| Valore ACA | Interpretazione |
|-------------|-----------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Borderline |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

La letteratura suggerisce che livelli positivi bassi di anticorpi anti-cardiolipina possono essere riscontrati in una varietà di patologie cliniche non collegate alla sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi. Pertanto, in accordo con le raccomandazioni degli investigatori, una diagnosi di sindrome da antifosfolipidi dovrebbe essere effettuata solo in caso di risultati moderatamente o altamente positivi ¹⁴.

LIMITAZIONI DEL TEST

Una diagnosi non può essere effettuata unicamente sulla base dei risultati ACA. Dovranno essere considerati i risultati di altri esami di laboratorio e le valutazioni cliniche. Occorrerà eseguire la serie di test per il fattore reumatoide (FR) in quanto quest'ultimo può interferire con il test per gli ACA. Nel caso di risultati negativi al test ACA in presenza della condizione clinica, è indicata l'esecuzione di un test per il lupus anticoagulante o di una serie di analisi aggiuntive. Gli ACA sono presenti in forma transitoria anche in una varietà di malattie infettive. In questi casi i pazienti che sono risultati positivi agli ACA dovrebbero essere testati nuovamente ad intervalli appropriati. I pazienti per i quali è confermata la presenza di sifilide attiva o la sieropositività alla malattia possono mostrare livelli elevati di ACA. Per escludere la sifilide, è necessario eseguire dei test di conferma.

VALORI ATTESI

L'incidenza degli ACA in alcune patologie è riassunta nella tabelle seguenti:

Incidenza degli ACA in LES ^{15,17}

| Isotipo Anticorpo | % Incidenza |
|-------------------|-------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Qualsiasi isotipo | 53 |

Associazione patologica degli ACA

| Condizione | % Incidenza |
|----------------------------|--------------------|
| Trombosi Venosa Ricorrente | 28-71 |
| Perdita Fetale Ricorrente | 28-64 |
| Mielite trasversa | 50 |
| Anemia Emolitica | 38 |
| Trombocitopenia | 27-33 |
| Occlusioni arteriose | 25-31 |
| Livedo Reticolare | 25 |
| Ipertensione Polmonare | 20-40 |

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Comparazione dei Metodi ELISA per l'Individuazione degli ACA

| | | IgG-ACA Immco™ | | |
|--------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| | | POS (+) | NEG (-) | TOT (=) |
| ImmuLisa™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 |
| | TOT (=) | 33 | 42 | 75 |

Specificità: 95,5%
Sensibilità: 100,0%
Concordanza: 97,3%

Precisione:

Due campioni con concentrazioni note di ACA sono state analizzate in 10 replicati nell'arco di un periodo di due settimane. Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio e tra un saggio e l'altro è il seguente:

| | Intra-piastra CV | Inter-piastra CV |
|----|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Recupero:

Campioni con concentrazioni note di ACA sono stati miscelati con la diluizione appropriata di un altro campione positivo con quantitativi noti di ACA. I valori ACA dei campioni addizionati sono stati successivamente determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero.

| | ACA addizionato | ACA ottenuto | % Recupero |
|----|------------------------|---------------------|-------------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |



IMMCO
DIAGNOSTICS

ImmuliTM ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-Cardiolipina (ACA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1118S ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-Cardiolipina 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um imunoensaio enzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-cardiolipina da classe IgG, IgA e IgM para auxílio na avaliação do risco de trombose em indivíduos com síndrome antifosfolípidos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos antifosfolípidos são um grupo heterogêneo de auto-anticorpos a fosfolípidos carregados negativamente¹. Esses são detectados principalmente pelo teste de anticorpos anti-cardiolipina (ACA), o teste biológico falsamente positivo a sífilis e o teste anticoagulante para Lúpus. Estes três testes detectam anticorpos relacionados mas não necessariamente idênticos. Assim, por vezes é necessário mais do que um destes testes para identificar anticorpos antifosfolípidos.

Dos diversos testes para a detecção de anticorpos antifosfolípidos, o teste de anticorpos anti-cardiolipina efectuado por ELISA é o mais sensível². A presença de anticorpos anti-cardiolipina ajuda a identificar doentes com risco de trombose venosa e/ou arterial muitas vezes acompanhada por trombocitopenia, uma síndrome referida como síndrome antifosfolípidos¹⁻¹². A síndrome antifosfolípidos apresenta-se com maior frequência em doentes com Lúpus eritematoso sistémico (LES) ou doentes tipo Lúpus nas quais não se apresenta o critério para LES⁵⁻⁷. Apresentam-se nveis elevados de anticorpos anti-cardiolipina em trombose, perda do feto, trombocitopenia e em muitas outras patologias¹⁻¹⁵. Foram registados nveis baixos de anticorpos anti-cardiolipina numa variedade de patologias clínicas que não estão relacionadas com a síndrome antifosfolípidos. Por conseguinte, nveis baixos destes anticorpos têm um significado limitado.

Os anticorpos anti-cardiolipina da classe IgG e IgA parecem estar mais estreitamente associados à síndrome antifosfolípidos do que os anticorpos da classe IgM. Todavia, os anticorpos IgM parecem ser mais influenciados pelo tratamento^{5,10}. Nveis baixos de anticorpos IgM podem ser identificados noutras doenças auto-imunes tais como a artrite reumatóide, Síndrome de Sjögren primária, Lúpus eritematoso induzido por medicamentos, doença de Lyme e sífilis^{8,10}.

O ELISA para Despiste de ACA ImmuliTM oferece um método de despiste conveniente do soro do doente da presença de ACA antes de outra identificação de amostras positivas a estes tipos individuais com o ELISA ACA-IgG, -IgA e -IgM ImmuliTM.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno cardiolipina liga-se aos pontos de uma placa de micropontos em polistireno seguida pelo bloqueio dos locais não reactivos para reduzir uma ligação inespecífica. Os controlos, calibradores e soros diluídos dos doentes são deitados em pontos separados, permitindo que todos os anticorpos anti-cardiolipina presentes se possam ligar ao antígeno imobilizado. A amostra que não se tenha ligado é eliminada por lavagem e junta-se um conjugado titulado com enzima a cada ponto. Estes anticorpos conjugados com enzima aderem especificamente à imunoglobulina humana da classe apropriada. Depois de eliminar por lavagem todo o conjugado que não se tiver ligado, junta-se um substrato enzimático específico (pNPP) aos pontos. Depois de interromper a reacção enzimática a intensidade da cor altera-se, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades ELISA por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize o reagente se não estiver limpo ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da

PT

utilização. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro com água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidos só devem ser utilizadas uma vez.

Precau es

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁶. AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizaç es de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instru es devem ser seguidas exactamente como est o indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc.

Respeite as técnicas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana e química. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Despiste de Anticorpos Anti-Cardiolipina ImmuLisa™ **REF** 1118S

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinaç es.

| | | |
|------------|--|---|
| 12 x 8 | MICROPLATE ACA | Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno cardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CALIBRATOR ACA SCREEN * | Calibrador pronto a usar (tampa verde). Soro humano contendo anticorpos anti-cardiolipina. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL + ACA SCREEN * | Controlo positivo pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para ACA. |
| 1 x 1,5 ml | CONTROL - * | Controlo negativo pronto a usar (tampa branca). Contém soro humano. |
| 1 x 12 ml | IgA/IgG/IgM - CONJ ALKPHOS * | Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa. |
| 2 x 60 ml | DIL * | Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul. |
| 1 x 12 ml | SUBSTRATE * | Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz. |
| 1 x 12 ml | STOP | Solução de paragem pronta a usar. |
| 2 x | BUF WASH | Tampão de lavagem em p . Reconstituir cada unidade em um litro. |







* Contém < 0.1% NaN₃

S mbolos utilizados nos r tulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

PT

-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

Pipetas para 5 a 1000 µl

- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente

Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipêmicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente estas instruções antes de iniciar o teste.
- Deixe que todos os reagentes e amostras estabilizem à temperatura ambiente (20-26 °C) por 30 minutos. Guarde os produtos imediatamente no frigorífico depois do uso.
- Prepare todas as diluições das amostras do doente antes de iniciar o teste.
- **Guarde imediatamente as tiras não usadas no pacote com dessecantes e feche bem para reduzir a exposição a vapor de água.**
- Passo de lavagem: É imprescindível uma boa técnica. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Os tempos são muito importantes. Os períodos de incubação iniciam após a distribuição dos reagentes.

Método de teste

1. **OS REAGENTES DEVEM ESTAR TODOS À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26 °C) ANTES DE INICIAR O TESTE.**

PT

- Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nas microplacas. É uma boa prática de laboratório testar as amostras em duplicado.
- Prepare uma diluição da amostra do doente a **1:201** misturando **5** μ l da amostra do doente com **1,0 ml** de Diluente de Soro.
- Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas.

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

| | | | | |
|---|-------|-----|---|---|
| A | BLANK | S5 | | |
| B | NEG | S6 | | |
| C | POS | S7 | | |
| D | CAL | S8 | | |
| E | S1 | S9 | | |
| F | S2 | S10 | | |
| G | S3 | S11 | | |
| H | S4 | S12 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |

- Junte **100** μ l de Calibradores, Controlos Positivo e Negativo e amostras do doente diluídas aos respectivos micropoços indicados na folha de protocolo
Nota: Inclua um poço com **100** μ l de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente. A absorvância deste poço não deve ser superior a 0,3.
- Incube **30 minutos** (\pm 5 minutos) à temperatura ambiente numa superfície plana.
- Passo de lavagem: Aspire muito bem o conteúdo de cada poço. Junte 200-300 μ l do tampão de lavagem reconstituído a todos os poços e depois aspire. Repita esta sequência mais três vezes por um total de quatro lavagens. Vire a placa ao contrário e bata em material absorvente para eliminar todos os resíduos fluidos após a última lavagem. Não enxugue completamente os poços.
- Junte 100 μ l de Conjugado a cada poço.
- Incube os poços por **30 minutos** (\pm 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo de lavagem: Repita o passo 7.
- Junte 100 μ l de Substrato enzimático a cada poço.
- Incube por **30 minutos** (\pm 5 min) à temperatura ambiente.
- Junte 100 μ l de Solução de Paragem em cada poço. Mantenha a mesma sequência e tempos da Solução de Paragem como efectuado para o Substrato Enzimático. Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm no prazo de uma hora da interrupção da reacção.
- Leia a absorvância (OD) de cada poço a 405 nm usando um leitor de comprimento de onda simples ou duplo em relação ao branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o reagente nulo devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do reagente nulo deverá ser $< 0,3$. O Calibrador deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras.

PT

RESULTADOS

Cálculos

O método seguinte deve ser utilizado para determinar se a amostra é positiva ou negativa a ACA.

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador}} \times \text{UE/ml de Calibrador} = \text{UE/ml da Amostra de Teste}$$

Abs. do Calibrador

Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

| ACA Screen Valor | Interpretação |
|------------------|---------------|
| <20 EU/ml | Neg (-) |
| 20-25 EU/ml | Indeterminado |
| >25 EU/ml | Pos (+) |

A literatura sugere que, níveis de anticorpos anti-cardiolipina positivos baixos podem apresentar-se numa variedade de patologias clínicas não relacionadas com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos. Consequentemente, de acordo com as recomendações dos investigadores o diagnóstico da síndrome de anticorpos antifosfolípidos só deve ser efectuado quando os resultados dos testes forem moderadamente ou altamente positivos¹⁴.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Não se poderá elaborar um diagnóstico apenas em base nos resultados de ACA. Devem ser considerados os resultados de outros testes de laboratório e exames clínicos. Os testes do factor reumatóide (FR) devem ser efectuados porque o FR pode interferir com este teste. Quando se regista um teste ACA negativo na presença de indicações clínicas, é aconselhável um teste anticoagulante para Lúpus ou outro teste adicional. Os ACA também se apresentam passageiramente numa variedade de doenças infecciosas. Nestes casos os doentes positivos a ACA devem ser novamente testados após um intervalo de tempo adequado. Os doentes confirmados activos ou seropositivos para sífilis podem ter níveis elevados de ACA. Para excluir a sífilis devem ser efectuados testes de confirmação.

VALORES PREVISTOS

A incidência de ACA em diversas condições de doença está resumida nas seguintes tabelas:

Incidência de ACA em LES^{15,17}

| Isótipo de Anticorpo | Incidência % |
|----------------------|--------------|
| IgG | 39-44 |
| IgA | 17-57 |
| IgM | 5-33 |
| Qualquer isótipo | 53 |

Associação de Doença com ACA

| Condição | Incidência % |
|----------------------------|--------------|
| Trombose Venosa Recorrente | 28-71 |
| Perda de Feto Recorrente | 28-64 |
| Mielite Transversa | 50 |
| Anemia Hemolítica | 38 |
| Trombocitopenia | 27-33 |
| Oclusões Arteriais | 25-31 |
| Livedo Reticularis | 25 |
| Hipertensão Pulmonar | 20-40 |

PT

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Comparação dos Métodos ELISA para a Detecção de ACA

| | | Immco™ IgG-ACA | | |
|-------------|---------|----------------|---------|---------|
| | | POS (+) | NEG (-) | TOT (=) |
| Immulin™ | POS (+) | 31 | 0 | 31 |
| ACA IgG/A/M | NEG (-) | 2 | 42 | 44 |
| | TOT (=) | 33 | 42 | 75 |

especificidade relativa: 95,5%

sensibilidade relativa: 100,0%

concordância relativa: 97,3%

Precisão:

Foram testadas duas amostras com concentrações conhecidas de ACA em 10 repetições durante um período de duas semanas. O coeficiente de variação intra- e inter-teste (CV) foi o seguinte:

| | Intra- Placa CV | Inter-Placa CV |
|----|--------------------|-------------------|
| 1. | 7,6% | 5,9% |
| 2. | 10,4% | 6,3% |

Amostras com concentrações conhecidas de ACA foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas de ACA. Os valores IgG-, IgA- e IgM-ACA das amostras indicadas foram então determinados e dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação.

| | ACA adicionado | ACA obtido | % Recuperação |
|----|----------------|------------|---------------|
| 1. | 127,0 | 135,8 | 106,9 |
| 2. | 103,8 | 103,2 | 99,4 |
| 3. | 64,3 | 61,2 | 95,2 |

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPÜIE • BIBLIOGRAFIA

1. Harris EN, Phil M, Asherson RA et al. Antiphospholipid antibodies - antibodies with a difference. *Ann Rev Med*; 1988, 39:261-271.
2. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD and Hughes GRV. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis*; 1988, 157:23-31.
3. Lockshin MD. Anti-cardiolipin antibody. *Arth Rheum*; 1987, 30:471-472.
4. Derksen RHW, Beisma D, Bouma BN et al. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin antibodies and the lupus anti-coagulant. *Arth Rheum*; 1986, 29:1295-1296.
5. Alarcón-Segovia D, Deleze M, Oria CV et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Medicine*; 1989, 68:353-365.
6. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*; 1989, 20:52-67.
7. Montecucco C, Longhi M, Caporali R et al. Hematological abnormalities associated with anticardiolipin antibodies. *Hematologica*; 1989, 74:195-204.
8. Asherson RA, Khamashta MA, ORDI-Ros J et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine*; 1989, 68:366-374.
9. Walport MJ. Pregnancy and antibodies to phospholipids. *Ann Rheum Dis*; 1989, 48:795-797.
10. Machworth-Young CG, Loizou S and Walport MJ. Antiphospholipid antibodies and disease. *Medicine*; 1989, 72:767-777.
11. Harris EN, Gharavi AE and Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheumatol*; 1985, 1:591-609.
12. Lubbe WF, Palmer SJ, Butler WS et al. Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus anticoagulant. *Lancet*; 1983, 1:1361-1363.
13. Hogan MJ, Brunet DG, Ford PM et al. Lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies and migraine. *Can J Neurological Sci*; 1988, 15:420-425.
14. Harris EN and Pierangeli S. Antiphospholipid antibodies: method of detection. *Am J Reproduct Immunol*; 1992, 28:208-210.
15. Silveira LH, Lopez LR, Uzzle RT et al. IgA, IgG and IgM anticardiolipin antibodies in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum 56th Annual Meeting*; 1992, S125.
16. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health; 1993, (HHS Pub. No [CDC] 93-8395).
17. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A perspective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine*; 1987, 68:353-365.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com