

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@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EMERGO Europe
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

NOV2012
Document No. PI5118



ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin Antibody (ACA) ELISAs

Cardiolipin/Phospholipid IgA, IgG or IgM Antibody ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUCT INSERT

REF	5118A	ACA IgA ELISA	96 Determinations
REF	5118G	ACA IgG ELISA	96 Determinations
REF	5118M	ACA IgM ELISA	96 Determinations

INTENDED USE

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgA Antibody (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Cardiolipin IgA antibodies in human serum to aid in the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) and APS associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgG Antibody (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Cardiolipin IgG antibodies in human serum to aid in the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) and APS associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgM Antibody (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative or semi-quantitative detection of Cardiolipin IgM antibodies in human serum to aid in the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) and APS associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in conjunction with other laboratory tests and clinical findings.

Warning: Confirmed active or seropositive syphilis patients can have elevated anti-cardiolipin antibody (ACA) levels. To rule out syphilis, confirmatory tests should be performed.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous group of autoantibodies against negatively charged phospholipids.¹ 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. The ELISA assay format is a highly sensitive method for detection of antiphospholipid antibodies.²

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 syndrome.¹⁻¹² The antiphospholipid syndrome most commonly occurs in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) or lupus-like disease where the criteria for SLE are not fulfilled.⁵⁻⁷ High levels of anti-cardiolipin antibodies occur in thrombosis, fetal loss, thrombocytopenia and several other disorders.¹⁻¹⁵ 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.

EN

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 Calibrators and Positive Control used in the kit have been standardized against the Harris calibration standards from the Antiphospholipid Standardization Laboratory.¹⁷

PRINCIPLES OF 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, calibrators 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 IgG, IgA or IgM conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the appropriate class. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (TMB) 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 450 nm. Results are expressed in units per milliliter (U/ml) according to the Harris classification. Units for IgG are expressed as GPL, for IgM as MPL and for IgA as APL.

REAGENTS

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

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.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

Coated microwell strips are for one time use only. Unused microwell strips should be carefully resealed in the pouch containing desiccants to prevent condensation and stored at 2-8°C.

Precautions

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 materials.¹⁸

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H₂SO₄) is poisonous and corrosive. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes. Avoid exposure to bases, metals or other compounds that may react with acids.

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ACA IgA ELISA
ACA IgG ELISA
ACA IgM ELISA

REF	5118A
REF	5118G
REF	5118M

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

REFERENCES

1. Harris EN et al. Antiphospholipid antibodies - antibodies with a difference. *Ann Rev Med.* 1988. 39:261-271.
2. Harris EN et al. 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 RHHM et al. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin antibodies and the lupus anti-coagulant. *Arth Rheum.* 1986. 29:1295-1296.
5. Alarcón-Segovia D et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A perspective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine;* 1987. 68:353-365.
6. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 1989. 20:52-67.
7. Montecucco C et al. Hematological abnormalities associated with anticardiolipin antibodies. *Hematologica.* 1989. 74:195-204.
8. Asherson RA 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. Antiphospholipid antibodies and disease. *Medicine.* 1989. 72:767-777.
11. Harris EN et al. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheumatol.* 1985. 1:591-609.
12. Lubbe WF et al. Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus anticoagulant. *Lancet.* 1983. 1:1361-1363.
13. Hogan MJ et al. Lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies and migraine. *Can J Neurological Sci.* 1988. 15:420-425.
14. Harris EN et al. Antiphospholipid antibodies: method of detection. *Am J Reproduct Immunol.* 1992. 28:208-210.
15. Silveira LH et al. IgA, IgG and IgM anticardiolipin antibodies in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum 56th Annual Meeting.* 1992. S125.
16. Harris, NE. The second international anti-cardiolipin standardization workshop/The Kingston antiphospholipid antibody study (KAPS) group. *Am J Clin Path.* 1990. 94:476-484.
17. Ichikawa K et al. A chimeric antibody with the human γ 1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG β 2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum.* 1999. 42:2461-70.
18. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
19. Miyakis S et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006. 4: 295-306.
20. Levy RA et al. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis. *J Rheumatol.* 1990. 17:1036-1041.
21. Ong SG et al. IgG anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in Malaysian patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical correlations. *Clin Rheumatol.* 2002. 21:382-5.
22. Ebrahim RA et al. Antiphospholipid syndrome among Bahraini patients. *Saudi Med J.* 2005. 26:488-90.
23. Amoroso A et al. Antibodies to anionic phospholipids and anti-beta2-GPI: association with thrombosis and thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2003. 64:265-73.
24. Vianna JL et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med.* 1994. 96:3-9.
25. Marai I et al. Anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I (beta2GP-I) antibody assays as screening for anti-phospholipid syndrome. *Hum Antibodies.* 2003. 12:57-62.
26. Gharavi AE et al. Antiphospholipid antibody tests. *Manual of clinical laboratory immunology sixth edition.* Rose NR et al (ed). 2002. 973-980.
27. Alarcon-Segovia D. et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A perspective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989. 68: 353-365.
28. Asherson RA et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine.* 1989. 68:366-374.
29. Asherson RA et al. Anticardiolipin antibodies-clinical associations. *Post Med J.* 1986. 62, 1081-1087.
30. Gezer S. Antiphospholipid Syndrome. *Dis Mon.* 2003. 49: 691-742.
31. Bick RL. Antiphospholipid Thrombosis Syndromes. *Clin Appl Thromb/Hemosta.* 1997. 7; 4: 241-258.

Limite de Detecção

Os limites de detecção (LoD) para os anticorpos ACA foram determinados com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das 6 amostras de baixo nível (NHS), como sendo: IgA 1,8 APL, IgG 0,6 GPL, e IgM 2,8 MPL.

Linearidade e Recuperação

Foram realizados estudos utilizando séries de diluições equidistantes de amostras positivas com valores por toda a faixa de calibração, para determinar a série linear do ensaio. A série linear do ensaio foi determinada como: IgA 1,8 para 120 APL, IgG 1,0 para 120 GPL e IgM 2,8 para 120 MPL. Os resultados são seguidamente resumidos. Sugere-se que as amostras que produzam resultados superiores ao calibrador principal sejam diluídas e novamente testadas, a fim de se obterem resultados semi-quantitativos rigorosos.

IgA	Série de Teste (APL)	Inclinação (95% CI)	Y-intercepção (95% CI)	R ²	% Recuperação (Obtida/Prevista)
	2,6 a 47,6	0,999 (0,95 a 1,05)	-0,52 (-1,95 a 9,91)	1	97,7% a 114,0%
	18,4 a 70,4	0,997 (0,85 a 1,15)	1,57 (-5,28 a 8,43)	0,98	85,1% a 101,9%
	20,0 a 107,6	1,126 (1,00 a 1,26)	0,07 (-9,49 a 9,62)	0,99	84,4% a 100%
IgG	Série de Teste (GPL)	Inclinação (95% CI)	Y-intercepção (95% CI)	R ²	% Recuperação (Obtida/Prevista)
	4,5 a 27,8	0,995 (0,94 a 1,05)	0,35 (-0,66 a 1,35)	1	90,8% a 101,1%
	2,4 a 98,1	0,989 (0,90 a 1,08)	-0,73 (-6,11 a 4,66)	0,99	95,9% a 114,6%
	3,1 a 107,5	1,168 (0,94 a 1,40)	-4,73 (-20,64 a 11,17)	0,97	82,6% a 102,8%
IgM	Série de Teste (MPL)	Inclinação (95% CI)	Y-intercepção (95% CI)	R ²	% Recuperação (Obtida/Prevista)
	5,6 a 28,3	0,925 (0,83 a 1,02)	1,70 (-0,05 a 3,44)	0,99	83,0% a 102,3%
	5,8 a 86,8	0,97 (0,87 a 1,07)	1,16 (-4,37 a 6,69)	0,99	93,4% a 106,9%
	5,5 a 103,6	0,939 (0,76 a 1,11)	4,78 (-5,89 a 15,46)	0,99	81,6% a 105,2%

Interferência

A interferência foi estudada, através da mistura do soro com os níveis conhecidos de ACA para cada isótopo com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as seguintes substâncias nos níveis indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), Factor Reumatóide (100 EU/ml), Triglicéridos (37 mmol/L) e Colesterol (13 mmol/L).

12 x 8

MICROPLATE|ACA

Microplate with individual breakaway microwells. Coated with cardiolipin antigen and bovine/human B2GP1. Ready for use.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-A

Ready to use Positive Control (red cap) for [REF] 5118A. Contains human serum positive for cardiolipin IgA antibodies. The expected concentration range in APL is printed on the label.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-G

Ready to use Positive Control (red cap) for [REF] 5118G. Contains human serum positive for cardiolipin IgG antibodies. The expected concentration range in GPL is printed on the label.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-M

Ready to use Positive Control (red cap) for [REF] 5118M. Contains human serum positive for cardiolipin IgM antibodies. The expected concentration range in MPL is printed on the label.

1 x 1.75 ml

CONTROL|-

Ready to use **Negative Control** (white cap). Contains human serum.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-A

Ready to use set of 5 Calibrators for [REF] 5118A. Calibrator A (green cap) 120 APL, Calibrator B (violet cap) 60 APL, Calibrator C (blue cap) 30 APL, Calibrator D (yellow cap) 15 APL, and Calibrator E (orange cap) 1 APL. Derived from human serum containing ACA IgA. Concentrations in APL are printed on the labels.

CALIBRATOR|B|ACA-A

CALIBRATOR|C|ACA-A

CALIBRATOR|D|ACA-A

CALIBRATOR|E|ACA-A

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-G

Ready to use set of 5 Calibrators for [REF] 5118G. Calibrator A (green cap) 120 GPL, Calibrator B (violet cap) 60 GPL, Calibrator C (blue cap) 30 GPL, Calibrator D (yellow cap) 15 GPL, and Calibrator E (orange cap) 1 GPL. Derived from human serum containing ACA IgG. Concentrations in GPL are printed on the labels.

CALIBRATOR|B|ACA-G

CALIBRATOR|C|ACA-G

CALIBRATOR|D|ACA-G

CALIBRATOR|E|ACA-G

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-M

Ready to use set of 5 Calibrators for [REF] 5118M. Calibrator A (green cap) 120 MPL, Calibrator B (violet cap) 60 MPL, Calibrator C (blue cap) 30 MPL, Calibrator D (yellow cap) 15 MPL, and Calibrator E (orange cap) 1 MPL. Derived from human serum containing ACA IgM. Concentrations in MPL are printed on the labels.

CALIBRATOR|B|ACA-M

CALIBRATOR|C|ACA-M

CALIBRATOR|D|ACA-M

CALIBRATOR|E|ACA-M

1 x 15 ml

IgA-CONJ|HRP

HRP goat anti-human IgA Conjugate for [REF] 5118A. Ready for use. Color coded pink.

1 x 15 ml

IgG-CONJ|HRP

HRP goat anti-human IgG Conjugate for [REF] 5118G. Ready for use. Color coded pink.

1 x 15 ml

IgM-CONJ|HRP

HRP goat anti-human IgM Conjugate for [REF] 5118M. Ready for use. Color coded pink.

1 x 60 ml

DIL

Serum Diluent. Ready for use.

1 x 15 ml

SUBSTRATE|TMB

TMB enzyme substrate. Ready for use. **Protect from light.**

1 x 15 ml

STOP|H2SO4

Stop Solution. Ready for use.

2 x vials

BUF|WASH

Powder Wash Buffer. **Reconstitute to one liter each.**

1 x

Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60ml **BUF** **WASH**Liquid concentrated Wash Buffer. **Reconstitute to one liter.**

Symbols used on labels

	Lot number
	Catalog number
	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions before use
	Number of tests
	Manufacturer

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

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. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip

Acordo Percentual Global:

91,2% (95% CI 88,5% - 93,3%)

Doença associada a temas (APS, SLE, APS com SLE, suspeita de APS e SLE): n = 408

Controles de doença: n = 182

B. Reactividade Cruzada: Foram testadas amostras com potencial de reatividade cruzada de indivíduos com outros distúrbios auto-imunes para anticorpos ACA, utilizando o Immulisa™ Reforçada™ ACA ELISA.

Condição	IgA n	Pos	% Pos	IgG n	Pos	% Pos	IgM n	Pos	% Pos
Doença celiaca	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
DMTC	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Miosite	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Artrite reumatóide	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
A síndrome de Sjögren	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Sífilis	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Esclerose sistêmica	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%
Tireoidite	8	0	0,0%	8	0	0,0%	7	0	0,0%

Precisão

A precisão foi testada com 6 amostras seleccionadas ao longo de todo o intervalo de ensaio. Foram conduzidos ensaios a 6 réplicas de cada amostra em 13 ensaios. A repetitibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada amostra.

Amostra	Média (U/ml)	Imprecisão Total SD (U/ml)	CV%	Entre dias SD (U/ml)	CV%	Na experiência (Repetitibilidade) SD (U/ml)	CV%
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

Reprodutibilidade

90 repetições de amostras no intervalo negativo baixa, perto do corte, na faixa positiva moderada e aproximadamente + /-20% dos cortes de ensaio para cada isotipo ACA foram realizadas para determinar a reprodutibilidade qualitativa. Resultados do ensaio para baixas amostras positivas moderadas e negativas produziram 100% de concordância qualitativa. + 20% espécimes produziram 98% (IgA), 99% (IgG) e acordo qualitativa de 98% (IgM). Amostras de corte aproximadas produziram 52% (IgA), 60% (IgG) e 60% (IgM) acordo qualitativa. -20% espécimes produziram 99% (IgA), 100% (IgG) e acordo qualitativa de 97% (IgM).

Categoria	n	IgA pos	%	n	IgG pos	%	n	IgM pos	%
APS com status desconhecido ACA	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
APS com envolvimento de SLE e status desconhecido ACA	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Sera submetido ao teste de APS	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
SLE	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Sera submetido ao teste de SLE	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Trombocitopenia	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Pre-eclampsia	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Outros auxílios*	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

* Outra doença autoimune incluí doença celíaca, miosite, artrite reumatóide, Esclerodermia, tireoidite e vasculite

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade da ImmuLISA™ ACA ELISAs foi avaliada através de testes a amostras bem caracterizadas de indivíduos com LES positivos para cardiolipina, a par de controlos de doenças. Estas amostras foram igualmente testadas em kits de teste ELISA comercialmente disponíveis. Só foram incluídas no método comparativo as amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são seguidamente resumidos.

A. ImmuLISA™ ACA ELISAs vs. outros ACA ELISAs:

		Outro ACA IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	105	15	120
ACA	Negativo	39	462	501
IgA ELISA	Total	144	477	621
Acordo percentual positivo:		72,9% (95% CI 64,8% - 79,8%)		
Acordo Percentual Negativo:		96,9% (95% CI 95,7% - 98,2%)		
Acordo Percentual Global:		91,3% (95% CI 88,7% - 93,3%)		
Doença associada a temas (APS, SLE, APS com SLE, suspeita de APS e SLE): n = 432				
Controles de doença: n = 189				

		Outro ACA IgG ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	155	32	187
ACA	Negativo	25	467	492
IgG ELISA	Total	180	499	679
Acordo percentual positivo:			86,1% (95% CI 80,0% - 90,6%)	
Acordo Percentual Negativo:			93,6% (95% CI 91,0% - 95,5%)	
Acordo Percentual Global:			91,6% (95% CI 89,2% - 93,5%)	

Outro ACA IgM ELISA				
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	119	2	121
ACA	Negativo	50	419	469
IgM ELISA	Total	169	421	590
Acordo percentual positivo:		70,4% (95% CI 62,8% - 77,1%)		
Acordo Percentual Negativo:		99,5% (95% CI 98,1% - 99,9%)		

wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**

- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

Step 1 Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.

Step 2 Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.

Step 3 For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.

or

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative				Semi-Quantitative			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Step 4 Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.

Step 5 Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.

Step 6 Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.

Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.

Step 7 Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

Step 8 Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.

Step 9 Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.

Step 10 Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

Step 11 Wash all microwells as in Step 8.

EN

- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 30 minutes of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, 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 A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 U/ml (<10 APL, GPL or MPL). If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining units. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{Units of Calibrator D} = \text{Units of Test Sample}$$

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in U/ml (APL, GPL, MPL) on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as "positive," "negative," or "indeterminate" with U/ml unit values. Indeterminate/borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods, as indicated in **Limitations of Procedure.**

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 normal blood donors and non-antiphospholipid syndrome disease control specimens. The mean of these subjects plus an optimized SD (IgA=3.5SD, IgG=3SD, IgM=3.5SD) was established as the assay cutoff and assigned a value of 15 U/ml based on titrations of the Harris standards. The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

PT

Calibrador

São incluídos Calibradores Prontos a Utilizar para fornecer a semi-quantificação, devendo ser utilizados em cada ensaio. As amostras de pacientes que contenham elevados níveis de anticorpos podem apresentar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos rigorosos, essas amostras devem ser ainda diluídas, de modo a recaírem na série da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para determinar valores U/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo factor de diluição.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ImmuLISA™ ACA Test não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipêmicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano.

Recomenda-se fortemente a realização de testes para os três isótipos de ACA. A realização de testes a apenas um e não à totalidade dos isótipos pode conduzir a resultados de falsos negativos. Além disso, não é possível efectuar um diagnóstico com base nos resultados isolados do ACA. Devem ser considerados os resultados de outros testes clínicos e laboratoriais. Quando ocorre um teste negativo ao ACA na presença de indicações clínicas, é indicado um teste do anticoagulante lúpico ou outros testes adicionais. O ACA também ocorre transitoriamente numa série de doenças infecciosas. Nestes casos, os pacientes positivos para ACA devem ser novamente testados após um intervalo apropriado. Os pacientes confirmados como seropositivos ou como portadores de sífilis activa podem possuir níveis elevados de ACA. Para excluir a sífilis, devem ser realizados testes de confirmação.

Os anticorpos anti-cardiolipina têm sido igualmente associados a síndromas neurológicos, como os efeitos isquémicos transitórios e a enxaqueca.¹³ Em contraste, nos pacientes com o síndrome antifosfolípide, os anticorpos normalmente persistem durante períodos mais longos, podendo inclusivamente preceder o início dos síndromas clínicos.²⁻⁴

VALORES ESPERADOS

A incidência de ACA em diversas condições de doenças é resumida nas tabelas seguintes:

Incidência do ACA no LES^{15,21-26}

Isotipo do anticorpo	SLE % incidência	APS % incidência
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Qualquer isotipo	53	71

Associação de Doenças da ACA^{24, 27-31}

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

Foram testados conjuntos de amostras clínicas pelo ImmuLISA™ ACA ELISA. Os resultados que demonstram a incidência deste estudo na população são seguidamente apresentados.

PT

ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para as determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve apresentar valores na range indicada na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do paciente podem ser determinadas por qualquer um dos seguintes métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

----- X Unidades do Calibrador D = Unidades da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos”. Os resultados das amostras superiores ou iguais ao Calibrador D são considerados positivos.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Traçar a absorvância do Calibrador A até E, consoante as respectivas concentrações em papel gráfico de registo linear. Traçar as concentrações em IU/ml (APL, GPL, MPL) no eixo X, consoante a absorvância no eixo Y, e desenhar uma curva que ligue os pontos. Determinar as concentrações das amostras do paciente a partir da curva, de acordo com os valores de absorvância correspondentes. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar uma curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários de U/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais, conforme indicado **nas Limitações do Procedimento**.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando dadores de sangue normal 64 e amostras de controlo de doença síndrome não antifosfolípide. A média destes indivíduos mais um SD optimizado (IgA=3,5SD, IgG=3SD, IgM=3,5SD) foi estabelecida como o corte do ensaio, tendo sido atribuído um valor de 15 U/ml, com base nas titragens dos princípios de Harris. O seguinte serve apenas como orientação para a interpretação dos resultados laboratoriais. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor ACA U/ml	Interpretação
<15 APL, GPL ou MPL	Negativo
15-22,5 APL, GPL ou MPL	Indeterminado (Linha Divisória)
>22,5 APL, GPL ou MPL	Positivo

A literatura sugere que podem ocorrer níveis reduzidos de anticorpos positivos anti-cardiolipina numa série de distúrbios clínicos não relacionados com o síndrome do anticorpo antifosfolípide. Deste modo, de acordo com as recomendações dos investigadores, o diagnóstico do Síndrome do anticorpo antifosfolípide só deve ser efectuado, quando os resultados dos testes forem moderadamente ou elevadamente positivos.¹⁴ Sugere-se que > 40 GPL ou MPL unidades ser empregada para diferenciar entre baixos níveis ACA positivos alheios a APS e moderados a altos níveis ACA associados com manifestações clínicas de APS.¹⁹

EN

ACA U/ml Value	Interpretation
<15 APL, GPL or MPL	Negative
15-22.5 APL, GPL or MPL	Indeterminate (Borderline)
>22.5 APL, GPL or MPL	Positive

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 positive.¹⁴ It is suggested that >40 GPL or MPL units be employed to differentiate between low positive ACA levels unrelated to APS and moderate to high ACA levels associated with clinical manifestations of APS.¹⁹

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining U/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

The Immulisa™ ACA Test should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only.

Testing for all three isotypes of ACA is strongly recommended. Testing for only one and not all isotypes may lead to false negative results. Furthermore, a diagnosis cannot be made on the basis of ACA results alone. The results of other laboratory tests and clinical findings must be considered. 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.²⁰

Anti-cardiolipin antibodies have also been associated with neurological syndromes such as transient ischemic effects and migraine.¹³ In contrast, in patients with antiphospholipid syndrome, the antibodies usually persist for longer periods and may even precede the onset of clinical symptoms.²⁻⁴

EXPECTED VALUES

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

Incidence of ACA in SLE and APS^{15, 21-25}

Antibody Isotype	SLE % Incidence	APS % Incidence
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Any isotype	53	71

EN

Disease Association of ACA^{24, 27-31}

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

Sets of clinical samples were tested on the Immulisa™ ACA ELISAs. Results demonstrating incidence in the populations for this study are provided below.

Category	IgA			IgG			IgM		
	n	pos	%	n	pos	%	n	pos	%
APS with unknown ACA status	127	11	8.7%	99	56	56.6%	108	38	35.2%
APS with SLE involvement and unknown ACA status	53	30	56.6%	95	47	49.5%	83	19	22.9%
Sera submitted for APS testing	188	14	7.4%	184	45	24.5%	188	13	6.9%
SLE	79	13	16.5%	83	20	24.1%	86	8	9.3%
Sera submitted for SLE testing	90	5	5.6%	88	13	14.8%	90	5	5.6%
Thrombocytopenia	15	1	6.7%	15	2	13.3%	15	0	0%
Pre-eclampsia	15	1	6.7%	15	3	20.0%	15	0	0%
Other AID*	214	6	2.8%	214	10	4.7%	231	15	6.5%
NHS	167	2	1.2%	164	5	3.0%	154	4	2.6%

* Other autoimmune disease includes celiac disease, myositis, rheumatoid arthritis, scleroderma, thyroiditis and vasculitis

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ Enhanced ACA ELISAs were evaluated by testing well-characterized specimens from cardiolipin positive SLE subjects alongside disease controls. These specimens were also tested on commercially available ELISA kits. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

A. Immulisa™ Enhanced ACA ELISAs vs. other ACA ELISAs:

Other ACA IgA ELISA				
IMMCO ACA IgA ELISA	Positive	Positive	Negative	Total
	Positive	105	15	120
	Negative	39	462	501
	Total	144	477	621

Positive Percent Agreement: 72.9% (95% CI 64.8% - 79.8%)
 Negative Percent Agreement: 96.9% (95% CI 95.7% - 98.2%)
 Overall Percent Agreement: 91.3% (95% CI 88.7% - 93.3%)

Disease associated subjects (APS, SLE, APS with SLE, suspected APS and SLE): n=432
 Disease controls: n=189

Other ACA IgG ELISA				
IMMCO ACA IgG ELISA	Positive	Positive	Negative	Total
	Positive	155	32	187
	Negative	25	467	492
	Total	180	499	679

PT

Qualitativa				Semi-quantitativa			
A	Branco	S5	Etc.	A	Branco	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

4º Passo Preparar uma diluição **1:101** das amostras dos pacientes, misturando **5 µl** do soro do paciente com **500ul** de Diluente de Soro.

5º Passo Remover os micropoços necessários da embalagem, recolocando as tiras não utilizadas na embalagem fechada, colocada no frigorífico. Colocar os micropoços com firmeza no suporte extra fornecido.

6º Passo Pipetar **100 µl** de Calibradores prontos a utilizar, controlos Positivo e Negativo e amostras de pacientes diluídas (**1:101**) nos micropoços apropriados, conforme a folha de protocolo.

Nota: Incluir um poço que contenha **100 µl** do Diluente de Soro como um reagente branco. Ajustar o leitor de ELISA para zero em relação ao reagente branco.

7º Passo Incubar durante **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

8º Passo Lavar 4x com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Descartar o líquido por inversão retirando os conteúdos de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para absorver o líquido da última lavagem, inverter as tiras e limpar os poços, vigorosamente, com toalhas de papel absorvente. Para lavadores automáticos, programar o lavador conforme as instruções do fabricante.

9º Passo Pipetar **100 µl** de Conjugado nos micropoços.

10º Passo Incubar durante 30 minutos (± 5 min) a temperatura ambiente.

11º Passo Lavar todos os micropoços conforme descrito no 8º Passo.

12º Passo Pipetar **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e timing utilizados para o Conjugado.

13º Passo Incubar durante 30 minutos (± 5 min) a temperatura ambiente.

14º Passo Pipetar **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, utilizando a mesma ordem e tempo utilizados na adição do Substrato Enzimático. Ler os valores de absorvância, no espaço de 30 minutos, da adição da solução de paragem.

15º Passo Ler a absorvância de cada micropoço a **450 nm**, utilizando um único, ou, a 450/630nm, utilizando um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda contra o reagente branco fixado em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e um reagente branco devem ser executados em cada ensaio, a fim de verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura de absorvância do reagente branco deve ser <0,3. O Calibrador A deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo negativo deve ser <10 U/ml (<10 APL, GPL or MPL). Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar as unidades. Quando se realizam determinações Qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve

PT

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2ª a 8°C durante o máximo de uma semana Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro deverão ser congeladas. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas de Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio.
- Permitir que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste se equilibrem a temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Eliminar as tiras necessárias dos micropoços da embalagem, voltando a fechá-la cuidadosamente, a fim de prevenir a condensação dos poços não utilizados. Voltar a colocar a embalagem de imediato no frigorífico.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Uma boa técnica de lavagem é fundamental** Se a lavagem for realizada manualmente, consegue-se uma lavagem adequada direccionando o fluxo energético do tampão de lavagem por toda a microplaca, através de um frasco de lavagem de ponta larga. **Recomenda-se a utilização de uma lavadora automática de microplacas.**
- Utilizar uma pipeta multicanal capaz de libertar 8 ou 12 poços em simultâneo. Este procedimento acelera o processo, fornecendo tempos de incubação mais uniformes.
- É importante o controlo cuidadoso do tempo para todos os passos. O início de todos os períodos de incubação começa com a conclusão da adição do reagente.
- A adição de todas as amostras e reagentes deve ser realizada na mesma proporção e na mesma sequência.

Método de Teste

1º Passo Permitir que todos os reagentes e amostras se equilibrem a uma temperatura ambiente

2º Passo Etiquetar folha de protocolo indicando a colocação da amostra nos poços. A execução das amostras em duplicado constitui uma boa prática laboratorial.

3º Passo Para obter uma **determinação qualitativa** utilizar apenas o Calibrador D (ampola com tampa amarela).

ou

Para uma **determinação semi-quantitativa** utilizar os Calibradores A até E, conforme se descreve no esquema de amostras seguinte.

EN

Positive Percent Agreement: 86.1% (95% CI 80.0% - 90.6%)
Negative Percent Agreement: 93.6% (95% CI 91.0% - 95.5%)
Overall Percent Agreement: 91.6% (95% CI 89.2% - 93.5%)

Disease associated subjects (APS, SLE, APS with SLE, suspected APS and SLE): n=464
Disease controls: n=217

Other ACA IgM ELISA				
IMMCO ACA IgM ELISA	Positive	Positive	Negative	Total
		119	2	121
	Negative	50	419	469
	Total	169	421	590

Positive Percent Agreement: 70.4% (95% CI 62.8% - 77.1%)
Negative Percent Agreement: 99.5% (95% CI 98.1% - 99.9%)
Overall Percent Agreement: 91.2% (95% CI 88.5% - 93.3%)

Disease associated subjects (APS, SLE, APS with SLE, suspected APS and SLE): n=408
Disease controls: n=182

B. Cross Reactivity: Sets of potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders were tested for ACA using the Immulisa™ Enhanced™ ACA ELISAs.

Condition	IgA n	Pos	% Pos	IgG n	Pos	% Pos	IgM n	Pos	% Pos
Celiac disease	21	0	0.0%	22	0	0.0%	24	0	0.0%
MCTD	24	1	4.2%	23	1	4.3%	29	3	10.3%
Myositis	3	0	0.0%	3	1	33.3%	4	0	0.0%
Rheumatoid arthritis	89	2	2.2%	89	6	6.7%	95	7	7.4%
Sjögren's syndrome	25	2	8.0%	25	2	8.0%	27	3	11.1%
Syphilis	40	6	15.0%	40	33	82.5%	40	14	35.0%
Systemic sclerosis	44	1	2.3%	44	0	0.0%	45	2	4.4%
Thyroiditis	8	0	0.0%	8	0	0.0%	7	0	0.0%

Precision

Precision was tested with 6 specimens selected throughout the range of the assay. Runs of 6 replicates of each specimen were conducted in 13 assays. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen.

Sample	Mean (U/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%
IgA 1	2.5	0.4	14.0%	0.366	14.6%	0.234	8.8%
IgA 2	12.4	1.0	8.0%	1.014	8.2%	0.915	7.4%
IgA 3	17.9	1.4	8.0%	1.470	8.2%	1.233	6.9%
IgA 4	29.1	2.4	8.2%	2.499	8.5%	1.466	5.2%
IgA 5	53.1	4.1	7.6%	4.182	7.9%	3.088	5.9%
IgA 6	103.7	6.8	6.5%	6.922	6.7%	5.847	5.5%
IgG 1	3.8	0.183	9.2%	0.177	8.6%	0.207	9.6%
IgG 2	12.0	1.117	9.3%	1.118	9.3%	1.050	9.1%
IgG 3	18.0	1.676	9.3%	1.723	9.5%	1.383	7.7%
IgG 4	31.3	2.738	8.7%	2.805	8.9%	1.651	5.5%
IgG 5	80.4	7.586	9.4%	8.049	10.0%	3.317	4.1%
IgG 6	99.0	6.806	6.9%	7.011	7.0%	4.560	4.7%
IgM 1	11.6	0.930	8.0%	0.930	8.0%	0.407	3.5%
IgM 2	13.0	1.084	8.4%	1.084	8.4%	0.904	7.0%
IgM 3	17.0	1.257	7.4%	1.257	7.4%	0.598	3.5%
IgM 4	45.7	2.292	5.0%	2.292	5.0%	1.305	2.9%
IgM 5	79.9	5.580	7.0%	5.580	7.0%	3.609	4.5%
IgM 6	114.8	6.603	5.8%	6.603	5.8%	4.811	4.2%

Reproducibility

90 replicates of samples in the low negative range, near the cutoff, in the moderate positive range, and approximately +/- 20% of the assay cutoffs for each ACA isotype were performed to determine qualitative reproducibility. Assay results for low negative and moderate positive specimens produced 100% qualitative agreement. +20% specimens produced 98% (IgA), 99% (IgG) and 98% (IgM) qualitative agreement. Approximate cutoff specimens produced 52% (IgA), 60% (IgG) and 60% (IgM) qualitative agreement. -20% specimens produced 99% (IgA), 100% (IgG) and 97% (IgM) qualitative agreement.

Limit of Detection

Based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples the limits of detection (LoD) for ACA antibodies were determined to be: IgA 1.8 APL, IgG 1 GPL, and IgM 2.8 MPL.

Linearity and Recovery

Studies were performed using equidistant dilution series of positive samples with values throughout the calibrator range to determine linear range of the assay. The linear range of the assay was determined to be: IgA 1.8 to 120 APL, IgG 1 to 120 GPL and IgM 2.8 to 120 MPL. Results are summarized below. It is suggested that samples producing results greater than the top calibrator be diluted and retested for accurate semi-quantitative results.

IgA	Test Range (APL)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R2	% Recovery (Obtnd/Expctd)
	2.6 to 47.6	0.999	-0.52	1	97.7% to 114.0%
		(0.95 to 1.05)	(-1.95 to 9.91)		
	18.4 to 70.4	0.997	1.57	0.98	85.1% to 101.9%
		(0.85 to 1.15)	(-5.28 to 8.43)		
	20.0 to 107.6	1.126	0.07	0.99	84.4% to 100%
IgG		(1.00 to 1.26)	(-9.49 to 9.62)		
	Test Range (GPL)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R2	% Recovery (Obtnd/Expctd)
	4.5 to 27.8	0.995	0.35	1	90.8% to 101.1%
		(0.94 to 1.05)	(-0.66 to 1.35)		
	2.4 to 98.1	0.989	-0.73	0.99	95.9% to 114.6%
		(0.90 to 1.08)	(-6.11 to 4.66)		
IgM	3.1 to 107.5	1.168	-4.73	0.97	82.6% to 102.8%
		(0.94 to 1.40)	(-20.64 to 11.17)		
	Test Range (MPL)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R2	% Recovery (Obtnd/Expctd)
	5.6 to 28.3	0.925	1.70	0.99	83.0% to 102.3%
		(0.83 to 1.02)	(-0.05 to 3.44)		
	5.8 to 86.8	0.97	1.16	0.99	93.4% to 106.9%
		(0.87 to 1.07)	(-4.37 to 6.69)		
	5.5 to 103.6	0.939	4.78	0.99	81.6% to 105.2%
		(0.76 to 1.11)	(-5.89 to 15.46)		

Interference

Interference was studied by mixing sera with known ACA levels for each isotype with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: Hemoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 µmol/L), Rheumatoid Factor (100 EU/ml), Triglycerides (37 mmol/L), and Cholesterol (13 mmol/L).

PT

1 x 15 ml [IgA-CONJ]HRP

1 x 15 ml [IgG-CONJ]HRP

1 x 15 ml [IgM-CONJ]HRP

1 x 60 ml [DIL]

1 x 15 ml [SUBSTRATE]TMB

1 x 15 ml [STOP]H2SO4

2 x [BUF]WASH

ampolas

1 x

Componentes Opcionais

1 x 60ml [BUF]WASH

Conjugado HRP de cabra anti IgA humano para [REF] 5118A. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

Conjugado HRP de cabra anti IgG humano para [REF] 5118G. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

Conjugado HRP de cabra anti IgM humano para [REF] 5118M. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.

Diluyente de Soro. Pronto a utilizar.

Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar, **Proteger da luz.**

Solução de Paragem. Pronto a utilizar.

Tampão de Lavagem de Pó. **Reconstituir para um litro cada.**

Folhas de Protocolo.

Tampão de Lavagem líquido concentrado. **Reconstituir para um litro.**

Símbolos utilizados nas etiquetas

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções antes de utilizar
	Número de testes
	Fabricante

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio limpos de 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorventes
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas de duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

PT

práticas laboratoriais, a fim de minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes aquando do seu manuseamento. Não utilizar os componentes do kit para além da data de validade impressa nas etiquetas.

Material fornecido

ACA IgA ELISA

ACA IgG ELISA

ACA IgM ELISA

REF 5118A

REF 5118G

REF 5118M

O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

12 x 8

MICROPLATE|ACA

Microplaca com micropoços individuais separados. Revestida com antígeno de cardiolipina bovinos/humanos B2GP1. Pronta a utilizar.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-A

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar para REF 5118A. Contém soro humano positivo para anticorpos IgA cardiolipina. A faixa de concentração esperada em APL está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-G

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar para REF 5118G. Contém soro humano positivo para anticorpos IgG cardiolipina. A faixa de concentração esperada em GPL está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-M

Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar para REF 5118M. Contém soro humano positivo para anticorpos IgM cardiolipina. A faixa de concentração esperada em MPL está impressa na etiqueta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|-

Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-A

CALIBRATOR|B|ACA-A

CALIBRATOR|C|ACA-A

CALIBRATOR|D|ACA-A

CALIBRATOR|E|ACA-A

Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para REF 5118A. Calibrador A (tampa verde) 120 APL, Calibrador B (tampa violeta) 60 APL, Calibrador C (tampa azul) 30 APL, Calibrador D (tampa amarela) 15 APL, e Calibrador E (tampa laranja) 1 APL. Derivado do soro humano contendo ACA IgA. As concentrações em APL estão impressas nas etiquetas.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-G

CALIBRATOR|B|ACA-G

CALIBRATOR|C|ACA-G

CALIBRATOR|D|ACA-G

CALIBRATOR|E|ACA-G

Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para REF 5118G. Calibrador A (tampa verde) 120 GPL, Calibrador B (tampa violeta) 60 GPL, Calibrador C (tampa azul) 30 GPL, Calibrador D (tampa amarela) 15 GPL, e Calibrador E (tampa laranja) 1 GPL. Derivado do soro humano contendo ACA IgG. As concentrações em GPL estão impressas nas etiquetas.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-M

CALIBRATOR|B|ACA-M

CALIBRATOR|C|ACA-M

CALIBRATOR|D|ACA-M

CALIBRATOR|E|ACA-M

Conjunto de 5 Calibradores pronto a utilizar para REF 5118M. Calibrador A (tampa verde) 120 MPL, Calibrador B (tampa violeta) 60 MPL, Calibrador C (tampa azul) 30 MPL, Calibrador D (tampa amarela) 15 MPL, e Calibrador E (tampa laranja) 1 MPL. Derivado do soro humano contendo ACA IgM. As concentrações em MPL estão impressas nas etiquetas.

EL



ImmuLisa Enhanced™

Cardiolipin αντισωμάτων (ACA) ELISAs

Cardiolipin/φωσφολιπίδια IgA, IgG ή IgM αντισωμάτων ELISA

IVD

For *in vitro* diagnostic use

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 5118A

ACA IgA ELISA

96 Προσδιορισμοί

REF 5118G

ACA IgG ELISA

96 Προσδιορισμοί

REF 5118M

ACA IgM ELISA

96 Προσδιορισμοί

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgA αντισωμάτων (ΣΕΔ) ELISA: ένζυμο συνδέεται ανοσολογική δοκιμή (ELISA) για την ανίχνευση ποιοτικά ή ημιποσοτική Cardiolipin IgA αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό βοήθημα για τη διάγνωση του συνδρόμου antiphospholipid (APS) και APS που συσχετίζονται με ερυθματώδους λύκος (Εταιρείας), σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακών εξετάσεων και κλινικών ευρημάτων.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgG αντισωμάτων (ΣΕΔ) ELISA: ένζυμο συνδέεται ανοσολογική δοκιμή (ELISA) για την ανίχνευση ποιοτικά ή ημιποσοτική Cardiolipin IgG αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό βοήθημα για τη διάγνωση του συνδρόμου antiphospholipid (APS) και APS που συσχετίζονται με ερυθματώδους λύκος (Εταιρείας), σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακών εξετάσεων και κλινικών ευρημάτων.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgM αντισωμάτων (ΣΕΔ) ELISA: ένζυμο συνδέεται ανοσολογική δοκιμή (ELISA) για την ανίχνευση ποιοτικά ή ημιποσοτική Cardiolipin IgM αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό βοήθημα για τη διάγνωση του συνδρόμου antiphospholipid (APS) και APS που συσχετίζονται με ερυθματώδους λύκος (Εταιρείας), σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακών εξετάσεων και κλινικών ευρημάτων.

Προεidoποίηση: Επιβεβαιωμένη σύφιλη ενεργό ή οροθετικούς ασθενείς μπορεί να έχουν αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων (ΣΕΔ) αντι-cardiolipin. Να αποκλειστεί σύφιλη, πρέπει να διεξάγονται δοκιμασίες επιβεβαίωσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι μια ετερογενής ομάδα αυτοαντισωμάτων έναντι αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων.¹ Ανιχνεύονται πρωτίστως με την δοκιμασία αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων (ACA), την ψευδώς-θετική δοκιμασία για σύφιλη και την δοκιμασία αντιπηκτικού λύκου. Αυτές οι τρεις δοκιμασίες ανιχνεύουν σχετικά, αλλά όχι απαραίτητα όμοια αντισώματα. Έτσι, περισσότερες από μία από αυτές της δοκιμασίες είναι ενίοτε απαραίτητες για την εξακρίβωση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Η μορφή της δοκιμασίας ELISA είναι μια άκρως ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων.²

Η παρουσία αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων βοηθά στην εξακρίβωση ασθενών με κίνδυνο φλεβικής και/ή αρτηριακής θρόμβωσης συνοδευόμενης συχνά από θρομβοπενία, σύνδρομο που αναφέρεται ως αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.¹⁻¹² Το αντιφωσφολιπιδικό

EL

σύνδρομο παρατηρείται πιο συχνά σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE) ή νόσο τύπου λύκου, όπου τα κριτήρια για τον SLE δεν πληρούνται.⁵⁻⁷ Υψηλά επίπεδα αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων παρατηρούνται στη θρόμβωση, την απώλεια εμβρύου, τη θρομβοπενία και αρκετές άλλες διαταραχές.¹⁻¹⁵ Χαμηλά επίπεδα αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων διαπιστώνονται σε ποικιλία κλινικών διαταραχών που δεν σχετίζονται με το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο. Ως εκ τούτου, τα χαμηλά επίπεδα αυτών των αντισωμάτων είναι περιορισμένης σπουδαιότητας.

Αντικαρδιολιπιδικά αντισώματα κατηγορίας IgG και IgA εμφανίζονται να συνδέονται πιο στενά με το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο παρά με αντισώματα κατηγορίας IgM. Ωστόσο, τα αντισώματα IgM εμφανίζονται να επηρεάζονται περισσότερο από τη θεραπεία.^{5,10} Χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων IgM antibodies μπορούν να εξακριβωθούν σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, πρωτοπαθές Σύνδρομο Sjögren, ερυθηματώδη λύκο προκαλούμενο από φάρμακα, νόσο του Lyme και σύφιλη.^{8,10} Οι Βαθμονομητές και ο Θετικός Έλεγχος που χρησιμοποιούνται στο kit έχουν τυποποιηθεί με τα κριτήρια βαθμονόμησης Harris από το Εργαστήριο Τυποποίησης Αντιφωσfolιπιδικών Αντισωμάτων.¹⁷

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το αντιγόνο της καρδιολιπίνης δεσμεύεται στις κυψελίδες ενός πλακιδίου μικροκυψελίδων από πολυστυρένιο και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι αραιωμένοι οροί ασθενών προστίθενται σε ξεχωριστές κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των υπαρχόντων αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης στο καθηλωμένο αντιγόνο. Το δείγμα που δε δεσμεύτηκε εκπλένεται και προστίθεται σε κάθε κυψελίδα ένα σημειωμένο με ένζυμο, συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG, IgA ή IgM. 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 (TMB). Αφού διακοπεί η ενζυματική αντίδραση, η ακεραιότητα της χρωματικής αλλαγής, η οποία είναι ανάλογη με την πυκνότητα του αντισώματος, διαβάζεται με ένα φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (U/ml), σύμφωνα με την ταξινόμηση Harris. Οι μονάδες για την IgG εκφράζονται ως GPL, για την IgM ως MPL και για την IgA ως APL.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αποθηκεύστε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. **Μην καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης, όταν αποθηκεύονται και μεταχειρίζονται σύμφωνα με την καθοδήγηση.

Μην χρησιμοποιείτε αν το αντιδραστήριο δεν είναι διαυγές ή υπάρχει ίζημα παρόν. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν τη χρήση.

Ανασυνθέστε το διάλυμα πλύσης στο 1 λίτρο με απεσταγμένο ή απιοντισμένο νερό. Όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C, το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

Οι λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων προορίζονται για χρήση μιας μόνο φορές. Οι μη χρησιμοποιηθείσες λωρίδες επενδεδυμένων βυθισμάτων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη σακούλα που περιέχει αποξηραντικές ουσίες για να αποφευχθεί υγραποίηση και να αποθηκεύονται στους 2-8°C.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν, τα προερχόμενα από τον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί για HBsAg, HCV, HIV-1 και 2 και HTLV-I και βρέθηκαν αρνητικά από δοκιμασίες που απαιτούνται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Ωστόσο, παράγωγα ανθρώπινου αίματος και δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά

PT

síndrome antifosfolípide. Por conseguinte, os níveis reduzidos destes anticorpos são de importância limitada.

Os anticorpos anti-cardiolipina da classe IgG e IgA parecem estar mais proximamente associados ao síndrome antifosfolípide do que os anticorpos da classe IgM. No entanto, os anticorpos IgM parecem ser mais influenciados pelo tratamento.^{5,10} Podem ser identificados níveis baixos de anticorpos IgM noutras doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, a Síndrome de Sjögren primária, o lúpus eritematoso induzido por drogas, a doença de Lyme e a Sífilis.^{8,10} Os Calibradores e o Controlo Positivo utilizados no kit foram padronizados tendo em conta os princípios de calibração de Harris do Antiphospholipid Standardization Laboratory.¹⁷

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno da cardiolipina é fixo aos poços de uma placa de micropoços de poliestireno, seguido do bloqueio dos locais sem reação, para reduzir a fixação não específica. Os controlos, os calibradores e o soro diluído do paciente são adicionados a poços separados, permitindo que quaisquer anticorpos da cardiolipina presentes se fixem ao antígeno imobilizado. A amostra não ligada é lavada, sendo adicionada a cada poço uma enzima conhecida como conjugado IgG, IgA ou IgM anti-humano. Estes anticorpos conjugados com a enzima fixam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe apropriada. Após a lavagem de qualquer conjugado não fixo, é posteriormente adicionado aos poços o substrato enzimático específico (TMB). Após a interrupção da reação enzimática, a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lida através de um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em unidades por mililitro (U/ml), de acordo com a classificação de Harris. As unidades para o IgG são expressas como GPL, para o IgM como MPL e para o IgA como APL.

REAGENTES

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Os reagentes são estáveis até à data de expiração, quando são armazenados e manuseados conforme as orientações.

Não utilizar reagentes se estes não apresentarem uma cor transparente ou se houver presença de um precipitado. Todos os reagentes devem ser guardados a temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem a 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando armazenado a 2-8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade do kit.

As tiras de revestimento dos micropoços destinam-se a uma única utilização. As tiras dos micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa com dessecantes, a fim de prevenir a condensação e ser armazenadas a 2-8°C.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. No entanto, os derivados do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser consideradas potencialmente infecciosos. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.¹⁷

A solução de paragem é uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos. Evitar a exposição a bases, metais ou outros compostos que possam reagir com ácidos.

O Substrato Enzimático TMB contém um irritante que pode ser nocivo se inalado, ingerido ou absorvido através da pele. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos.

As instruções devem ser seguidas exactamente conforme constam no presente folheto deste kit, a fim de assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit com componentes provenientes de outras fontes. Devem ser cumpridas as boas



Immula Enhanced™

Anticorpo cardiolipina (ACA) ELISA

Phospholipid/cardioplipina IgA, IgG ou anticorpos IgM ELISA

[IVD] For *in vitro* diagnostic use

FOLHETO DO PRODUTO

[REF]	5118A	ACA IgA ELISA	96 Determinações
[REF]	5118G	ACA IgG ELISA	96 Determinações
[REF]	5118M	ACA IgM ELISA	96 Determinações

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Immula™ cardiolipina IgA anticorpos (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos cardiolipina IgA no soro humano para auxiliar no diagnóstico de síndrome antifosfolípide (APS) e APS associados com Lúpus eritematoso sistêmico (SLE) em conjunto com outros testes laboratoriais e achados clínicos.

Immula™ cardiolipina IgG anticorpo (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos cardiolipina IgG no soro humano, para auxiliar no diagnóstico de síndrome antifosfolípide (APS) e APS associados com Lúpus eritematoso sistêmico (SLE) em conjunto com outros testes laboratoriais e achados clínicos.

Immula™ cardiolipina IgM anticorpo (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos cardiolipina IgM no soro humano, para auxiliar no diagnóstico de síndrome antifosfolípide (APS) e APS associados com Lúpus eritematoso sistêmico (SLE) em conjunto com outros testes laboratoriais e achados clínicos.

Aviso: Sífilis ativa ou seropositivos confirmados pacientes podem ter anti cardiolipina anticorpo (ACA) níveis elevados. Para descartar sífilis, devem ser realizados testes confirmatórios.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos antifosfolípidos são um grupo heterogêneo dos auto-anticorpos contra os fosfolípidos carregados negativamente.¹ São principalmente detectados através do teste ao anticorpo anti-cardiolipina (ACA), do teste biológico falso positivo para a sífilis, ou do teste do anticoagulante lúpico. Estes três testes detectaram anticorpos relacionados, embora não necessariamente idênticos. Além disso, mais do que um destes testes podem ser por vezes necessários para identificar anticorpos antifosfolípidos. O formato do ensaio ELISA constitui um método altamente sensível para a detecção de anticorpos antifosfolípidos.²

A presença de anticorpos anti-cardiolipina ajuda a identificar pacientes em risco de trombose venosa e/ou arterial, muitas vezes acompanhada por trombocitopenia, um síndrome referenciado como síndrome antifosfolípide. 1-12 Este ocorre mais comumente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), ou com doenças semelhantes ao lúpus, em que os critérios para o LES não são preenchidos. 5-7 Existe a presença de níveis elevados de anticorpos anti-cardiolipina na trombose, na perda fetal, na trombocitopenia e em diversos outros distúrbios. 1-15 Foram encontrados níveis reduzidos de anticorpos anti-cardiolipina numa série de distúrbios clínicos, não relacionados com o

molusmatiká. Tηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.¹⁷

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το φάτε και αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε τη έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες ενώσεις που μπορεί να αντιδρούν με οξέα.

Το Υπόστρωμα Ενζύμου TMB περιέχει μια ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επιβλαβής αν την εισπνεύσετε, την φάτε ή απορροφηθεί μέσω του δέρματος. Μην το φάτε και αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος κιτ για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα. Μην εναλλάσσετε στοιχεία του κιτ με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-μόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείται στοιχεία του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρασχέθηκαν

ACA IgA ELISA	[REF]	5118A
ACA IgG ELISA	[REF]	5118G
ACA IgM ELISA	[REF]	5118M

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	[MICROPLATE ACA]	Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης (breakaway microwells). Επενδεδυμένη με αντιγόνο καρδιολιπίνης βοοειδών/ανθρώπινα B2GP1. Έτοιμη προς χρήση.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + ACA-A]	Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα) για [REF] 5118A. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα IgA καρδιολιπίνης. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε APL εμφανίζεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + ACA-G]	Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα) για [REF] 5118G. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα IgG καρδιολιπίνης. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε GPL εμφανίζεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + ACA-M]	Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (Positive Control) (κόκκινο πώμα) για [REF] 5118M. Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα IgM καρδιολιπίνης. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε MPL εμφανίζεται στην ετικέτα.
1 x 1.75 ml	[CONTROL -]	Έτοιμος προς χρήση Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control) (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A ACA-A] [CALIBRATOR B ACA-A] [CALIBRATOR C ACA-A] [CALIBRATOR D ACA-A] [CALIBRATOR E ACA-A]	Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών για [REF] 5118A. Ο Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα) 120 APL, ο Βαθμονομητής B (μωβ πώμα) 60 APL, ο Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 30 APL, ο βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 15 APL, και ο Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 APL. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα ACA IgA. Συγκεντρώσεις σε APL αναγράφονται στις ετικέτες.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A ACA-G] [CALIBRATOR B ACA-G]	Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών για [REF] 5118G. Ο Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 120 GPL, ο Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 60

EL

	CALIBRATOR C ACA-G
	CALIBRATOR D ACA-G
	CALIBRATOR E ACA-G

5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-M
	CALIBRATOR B ACA-M
	CALIBRATOR C ACA-M
	CALIBRATOR D ACA-M
	CALIBRATOR E ACA-M

1 x 15 ml	IgA-CONJ HRP
-----------	--------------

1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP
-----------	--------------

1 x 15 ml	IgM-CONJ HRP
-----------	--------------

1 x 60 ml	DIL
-----------	-----

1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB
-----------	---------------

1 x 15 ml	STOP H2SO4
-----------	------------

2 x	BUF WASH
-----	----------

φιαλίδια

1 x

Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml	BUF WASH
----------	----------

GPL, ο Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 30 GPL, ο βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 15 GPL, και ο Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 GPL. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα ACA IgG. Συγκεντρώσεις σε GPL αναγράφονται στις ετικέτες.

Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών για [REF] 5118M. Ο Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 120 MPL, ο Βαθμονομητής Β (μωβ πώμα) 60 MPL, ο Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 30 MPL, ο βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 15 MPL, και ο Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 MPL. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα ACA IgM. Συγκεντρώσεις σε MPL αναγράφονται στις ετικέτες.

Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgA Conjugate) για [REF] 5118A. Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgG Conjugate) για [REF] 5118G. Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα. (HRP goat anti-human IgM Conjugate) για [REF] 5118M. Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμο προς χρήση.

Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB enzyme substrate). Έτοιμο προς χρήση. **Προστατέψτε από το φως.**

Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμο προς χρήση.

Διάλυμα Πλύσης σε μορφή Σκόνης (Powder Wash Buffer). **Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο έκαστο.**

Φύλλα Πρωτοκόλλου

Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.

IT

IgA	Intervallo del test (APL)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/atteso)
	da 2,6 a 47,6	0,999 (da 0,95 a 1,05)	-0,52 (da -1,95 a 9,91)	1	da 97,7% a 114,0%
	da 18,4 a 70,4	0,997 (da 0,85 a 1,15)	1,57 (da -5,28 a 8,43)	0,98	da 85,1% a 101,9%
	da 20,0 a 107,6	1,126 (da 1,00 a 1,26)	0,07 (da -9,49 a 9,62)	0,99	da 84,4% a 100%

IgG	Intervallo del test (GPL)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/atteso)
	da 4,5 a 27,8	0,995 (da 0,94 a 1,05)	0,35 (da -0,66 a 1,35)	1	da 90,8% a 101,1%
	da 2,4 a 98,1	0,989 (da 0,85 a 1,08)	-0,73 (da -6,11 a 4,66)	0,99	da 95,9% a 114,6%
	da 3,1 a 107,5	1,168 (da 0,94 a 1,40)	-4,73 (da -20,64 a 11,17)	0,97	da 82,6% a 102,8%

IgM	Intervallo del test (MPL)	Pendenza (IC al 95%)	Intercetta Y (IC al 95%)	R ²	% recupero (ottenuto/atteso)
	da 5,6 a 28,3	0,925 (da 0,83 a 1,02)	1,70 (da -0,05 a 3,44)	0,99	da 83,0% a 102,3%
	da 5,8 a 86,8	0,97 (da 0,87 a 1,07)	1,16 (da -4,37 a 6,69)	0,99	da 93,4% a 106,9%
	da 5,5 a 103,6	0,939 (da 0,76 a 1,11)	4,78 (da -5,89 a 15,46)	0,99	da 81,6% a 105,2%

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di ACA per ogni isotipo con campioni di siero potenzialmente interferenti e studiando la deviazione dai risultati previsti. Non è stata dimostrata un'interferenza significativa per le seguenti sostanze ai livelli indicati: emoglobina (2 g/l), bilirubina (342 μmol/l) e fattore reumatoide (100 UE/ml), trigliceridi (37 mmol/l) e colesterolo (13 mmol/l).

IT

Precisione

La precisione è stata testata con 6 campioni selezionati attraverso l'intervallo del dosaggio. In 13 dosaggi sono state condotte sessioni di 6 replicati di ogni campione. La ripetibilità è stata determinata con 12 replicati di ogni campione.

Campione	Media (U/ml)	Imprecisione totale		Tra i giorni		Tra le sessioni (Ripetibilità)	
		DS (U/ml)	CV %	DS (U/ml)	CV %	DS (U/ml)	CV %
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

Riproducibilità

90 repliche dei campioni in basso gamma negativa, nei pressi di cutoff, nella gamma positiva moderata e circa + /-20% di cut-off il dosaggio per ogni isotipo ACA sono state eseguite per determinare la riproducibilità qualitativa. Risultati di dosaggio per bassi campioni positivi negativi e moderati prodotto 100% accordo qualitativa. + 20% campioni prodotto 98% (IgA), 99% (IgG) e qualitativa accordo 98% (IgM). Esemplari di taglio approssimativi prodotto 52% (IgA), 60% (IgG) e 60% (IgM) accordo qualitativa. -20% campioni prodotto 99% (IgA), 100% (IgG) e qualitativa accordo 97% (IgM).

Limite di rilevamento

In base a 60 replicati del bianco e 10 replicati di ognuno dei 6 campioni a basso livello (NHS) il limite di rilevamento (LoD) per gli anticorpi anti-ACA determinato è stato: IgA 1,8 APL, IgG 0,6 GPL e IgM 2,8 MPL.

Linearità e recupero

Per determinare l'intervallo lineare del dosaggio, sono stati effettuati studi utilizzando serie di diluizioni equidistanti dei campioni positivi con i valori attraverso l'intervallo del calibratore. L'intervallo lineare del dosaggio determinato è stato di: IgA da 1,8 a 120 APL, IgG da 1,0 a 120 GPL e IgM da 2,8 a 120 MPL. I risultati sono riepilogati di seguito. Per risultati semiquantitativi accurati, si raccomanda di diluire e ripetere il test sui campioni che producono risultati maggiori al calibratore superiore.

EL

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες

	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός καταλόγου
	Για in vitro διαγνωστική χρήση
	Ημερομηνία λήξης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση
	Αριθμός δοκιμών
	Κατασκευαστής

Υλικά Που Απαιτούνται Αλλά Δεν Παρέχονται

- Απιοντισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτο πλαστικό μπουκάλι για το αραιωμένο διάλυμα πλύσης
- Πιπέτες ικανές να απελευθερώνουν 5 μl έως 1000 μl
- Ρύγχη πιπέτων (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρηση
- Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
- Αναγνώστης μικροπλάκας ικανός για την ανάγνωση τιμών απορροφητικότητας στα 450 nm. Εάν είναι διαθέσιμος αναγνώστης μικροπλάκας διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να οριστεί στα 600-650 nm
- Αυτόματο πλυντήριο μικροπλάκας ικανό να διανέμει 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μόνον δείγματα ορού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σ' αυτήν τη διαδικασία. Αιμολυμένα, λιπαιμικά ή βακτηριδιακά επιμολυσμένα δείγματα μπορούν να παρεμβληθούν στην εκτέλεση της δοκιμασίας και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα δεν θα πρέπει να φυλάσσονται για παραπάνω από μία εβδομάδα στους 2°- 8°C. Για αποθήκευση μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγετε επανειλημμένη απόψυξη και νέα ψύξη των δειγμάτων. Συνιστάται τα κατεψυγμένα δείγματα να υποβάλλονται σε έλεγχο εντός ενός έτους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Διαδικαστικές Σημειώσεις

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος πριν ξεκινήσετε τη δοκιμασία.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια δοκιμασίας να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας δοκιμασίας. Βάζετε πίσω όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήσατε στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση.
- Αφαιρείτε τις απαιτούμενες λωρίδες βυθισμάτων από τη σακούλα και προσεκτικά σφραγίζετε ξανά τη σακούλα για να αποφύγετε υγραποίηση στα μη χρησιμοποιηθέντα βυθίσματα. Βάζετε τη σακούλα πίσω στο ψυγείο αμέσως.
- Όλα τα διαλύματα των δειγμάτων του ασθενούς θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη της δοκιμασίας.

EL

- **Η τεχνική καλής πλύσης είναι πολύ σημαντική.** Αν η πλύση εκτελείται με το χέρι, η σωστή πλύση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας δυνατή ροή διαλύματος πλύσης με φιάλη πλύσης με ανοιχτό στόμιο σε ολόκληρη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.**
- Χρησιμοποιείτε πολυκάναλη πιπέτα ικανή να απελευθερώνει 8 ή 12 κοιλότητες ταυτόχρονα. Αυτό επιταχύνει τη διαδικασία και παρέχει χρόνους πιο ομοιόμορφης επώασης.
- Σε όλα τα βήματα, ο προσεκτικός έλεγχος χρονισμού είναι σημαντικός. Η έναρξη όλων των περιόδων επώασης γίνεται με την ολοκλήρωση της προσθήκης αντιδραστήριου.
- Προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και την ίδια ακολουθία.

Μέθοδος Δοκιμής

Βήμα 1 Αφήνετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να εξισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 2 Τοποθετείτε ετικέτα στο φύλλο πρωτοκόλλου για να υποδηλώσετε την τοποθέτηση δείγματος στις κοιλότητες. Αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική να εκτελείτε τα δείγματα εις διπλούν.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο Βαθμονομητή Δ (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα).

ή

Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε Βαθμονομητές Α έως Ε, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διάταξη δειγματος.

Ποιοτικός				Ημι-Ποσοτικός			
A	Κενός	S5	Κ.λπ.	A	Κενός	S1	Κ.λπ.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Βήμα 4 Προετοιμάζετε διάλυμα **1:101** από τα δείγματα ασθενών αναμειγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500ul** Ορού Αραίωσης.

Βήμα 5 Αφαιρείτε τα απαιτούμενα βυθίσματα από το σάκο και βάζετε πίσω τις λωρίδες που δεν έχετε χρησιμοποιήσει στη σφραγισμένη σακούλα στο ψυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

Βήμα 6 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** τους Έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές, τους Θετικούς και Αρνητικούς ελέγχους και τα αραιωμένα δείγματα ασθενών (**1:101**) στα κατάλληλα βυθίσματα σύμφωνα με το φύλλο πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Συμπεριλάβετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστήριου.

Βήμα 7 Επιδράζετε για **30 λεπτά** ($\pm$ 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8 Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίστε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάζτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή

IT

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità dei dosaggi ImmuLisTM ACA ELISA è stata valutata testando campioni ben caratterizzati da soggetti LES cardiopina positivi accanto a controlli. Questi campioni sono anche stati testati su kit ELISA commercialmente disponibili. Il confronto dei metodi ha incluso solo i campioni nell'intervallo lineare del dosaggio. Questi risultati sono riepilogati nella seguente tabella.

A. ImmuLisTM ACA ELISA vs. altri ACA ELISA:

		Altri ACA IgA ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO anti-ACA IgA ELISA	Positivo	105	15	120
	Negativo	39	462	501
	Totale	144	477	621

Concordanza percentuale positiva: 72,9% (IC al 95%: da 64,8% a 79,8%)
Concordanza percentuale negativa: 96,9% (IC al 95%: da 95,7% a 98,2%)
Concordanza percentuale totale: 91,3% (IC al 95%: da 88,7% a 93,3%)

Malattia associati soggetti (APS, SLE, APS con SLE, sospetti di APS e SLE): n = 432
Controlli di malattia: n = 189

		Altri ACA IgG ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO anti-ACA IgG ELISA	Positivo	155	32	187
	Negativo	25	467	492
	Totale	180	499	679

Concordanza percentuale positiva: 86,1% (IC al 95%: da 80,0% a 90,6%)
Concordanza percentuale negativa: 93,6% (IC al 95%: da 91,0% a 95,5%)
Concordanza percentuale totale: 91,6% (IC al 95%: da 89,2% a 93,5%)

Malattia associati soggetti (APS, SLE, APS con SLE, sospetti di APS e SLE): n = 464
Controlli di malattia: n = 217

		Altri ACA IgM ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO anti-ACA IgM ELISA	Positivo	119	2	121
	Negativo	50	419	469
	Totale	169	421	590

Concordanza percentuale positiva: 70,4% (IC al 95%: da 62,8% a 77,1%)
Concordanza percentuale negativa: 99,5% (IC al 95%: da 98,1% a 99,9%)
Concordanza percentuale totale: 91,2% (IC al 95%: da 88,5% a 93,3%)

Malattia associati soggetti (APS, SLE, APS con SLE, sospetti di APS e SLE): n = 408
Controlli di malattia: n = 182

B. Reattività crociata: set di campioni con reattività crociata potenziale, provenienti da soggetti con altri disturbi autoimmuni quando testati per gli ACA utilizzando i dosaggi ImmuLisTM EnhancedTM ACA ELISA.

Condizione	IgA			IgG			IgM		
	n	Pos	% Pos	n	Pos	% Pos	n	Pos	% Pos
Malattia celiaca	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
MCTD	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Miosite	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Artrite reumatoide	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
Sindrome di Sjögren	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Sifilide	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Sclerosi sistemica	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%
Tiroidite	8	0	0,0%	8	0	0,0%	7	0	0,0%

IT

laboratorio e i riscontri clinici. Quando il test ACA è negativo in presenza di certe indicazioni cliniche, sono indicati un test per il lupus anticoagulante o altre analisi complementari. Gli ACA sono anche transitoriamente presenti in una varietà di malattie infettive. In questi casi, i pazienti ACA positivi devono essere nuovamente testati dopo un intervallo di tempo appropriato. I pazienti con sifilide attiva confermata o sieropositivi possono avere livelli di ACA elevati. Per escludere la sifilide, vanno effettuati i test di conferma.

Gli anticorpi anticardiolipina sono stati inoltre associati con sindromi neurologiche, quali effetti ischemici transitori ed emicrania.¹³ Al contrario, nei pazienti con sindrome da antifosfolipidi, gli anticorpi persistono solitamente per periodi maggiori e possono persino precedere l'esordio dei sintomi clinici.²⁻⁴

VALORI PREVISTI

Le seguenti tabelle riepilogano l'incidenza degli ACA in varie condizioni di malattia:

Incidenza degli ACA nel LES^{15,21-26}

Anticorpo Isotype	SLE % incidenza	% di incidenza APS
IgG	36-39	44-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Ogni isotipo	53	71

Associazione patologica degli ACA^{24, 27-31}

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 reticularis	25
Ipertensione polmonare	20-40

Le serie di campioni clinici sono state testate con i dosaggi Immulisa™ ACA ELISA. La tabella seguente fornisce i risultati dell'incidenza nelle popolazioni per questo studio.

Categoria	IgA			IgG			IgM		
	n	pos	%	n	pos	%	n	pos	%
APS con stato sconosciuto ACA	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
APS con coinvolgimento di SLE e stato sconosciuto ACA	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Sieri sottoposti alle prove di APS	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
SLE	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Sieri inviati per la verifica SLE	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Trombocitopenia	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Pre-eclampsia	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Altri aiuti *	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

* Altre malattie autoimmuni includono la malattia celiaca, miosite, artrite reumatoide, sclerodermia, tiroiditi e vasculite

EL

anarrofώντας το υγρό από κάθε κοιλότητα. Για να κάνετε αποτύπωση στο τέλος της τελευταίας πλύσης, αναστρέψτε τις λωρίδες και κτυπήστε τοις κοιλότητες έντονα πάνω σε απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες. Για αυτόματες συσκευές πλυσίματος, προγραμματίστε την συσκευή πλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βήμα 9 Βάζετε με την πιπέτα **100 μl** της Σύζευξης σε βυθίσματα.

Βήμα 10 Επιδάξτε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 11 Πλένετε όλα τα βυθίσματα, όπως περιγράφεται στο Βήμα 8.

Βήμα 12 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για τη Σύζευξη.

Βήμα 13 Επιδάξτε για **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 14 Διανέμετε με την πιπέτα **100 μl** Διαλύματος Παύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του Ενζυμικού Υποστρώματος. Διαβάστε τις τιμές απορροφητικότητας εντός **30 λεπτών** από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

Βήμα 15 Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βυθίσματος σε **450 nm** χρησιμοποιώντας μονού ή στα 450/630nm χρησιμοποιώντας διπλού μήκους κύματος συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας έναντι του σετ κενού αντιδραστήριου σε μηδενική απορροφητικότητα.

Ποιοτικός Έλεγχος

Οι Βαθμονομητές, ο Θετικός και Αρνητικός Έλεγχος και ένα κενό αντιδραστήριο πρέπει να εκτελούνται με κάθε δοκιμασία για την εξακρίβωση της ακεραιότητας και ακρίβειας της δοκιμασίας. Η ένδειξη απορροφητικότητας του κενού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι μικρότερη του 0,3. Ο Βαθμονομητής Α θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 1,0, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι < 10 U/ml (<10 APL, GPL ή MPL). Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό των μονάδων. Κατά την εκτέλεση των Ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή Δ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς ο θετικός έλεγχος πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας

----- X Μονάδες Βαθμονομητή Δ = Μονάδες του Δείγματος Δοκιμασίας

Απόρ. Βαθμονομητή Δ

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως "θετικά" ή "αρνητικά." Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αποτυπώστε την απορροφητικότητα των Βαθμονομητών Α έως Ε έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε χαρτί γραφημάτων γραμμικού αρχείου καταγραφής (linear-log graph paper). Αποτυπώστε τις συγκεντρώσεις σε U/ml (MPL APL, GPL) στον Χ-άξονα έναντι της απορροφητικότητας στον Υ-άξονα και σχεδιάστε μια καμπύλη

προσαρμογής από σημείο σε σημείο. Καθορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ασθενών από την καμπύλη σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφητικότητας. Εναλλακτικά, μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση της πρότυπης καμπύλης.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως "θετικά," "αρνητικά," ή "απροσδιόριστα" με τιμές μονάδας U/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους, όπως δηλώνεται στους **Περιορισμούς Διαδικασίας**.

Ερμηνεία

Ερμηνεία τιμών καθορίζονταν από δοκιμές 64 κανονική αιμοδοτές και μη-antiphospholipid σύνδρομο νόσου έλεγχο δειγμάτων. Ο μέσος όρος αυτών των υποκειμένων μαζί με ένα βελτιστοποιημένο SD (IgA=3,5SD, IgG=3SD, IgM=3,5SD) καθιερώθηκε ως το έσχατο σημείο της δοκιμασίας και καθόρισε την τιμή των 15 U/ml επί τη βάσει των τιτλοδοτήσεων των προτύπων Harris. Οι ακόλουθες πληροφορίες εξυπηρετούν μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή ACA U/ml	Ερμηνεία
<15 APL, GPL ή MPL	Αρνητικό
15-22,5 APL, GPL ή MPL	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>22,5 APL, GPL ή MPL	Θετικό

Η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι μπορεί να παρατηρηθούν χαμηλά επίπεδα θετικών αντισωμάτων αντικαρδιολιπίνης σε μια ποικιλία κλινικών διαταραχών που δεν σχετίζονται με το σύνδρομο αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων. Έτσι, σύμφωνα με τις συστάσεις των ερευνητών η διάγνωση του συνδρόμου αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων, θα πρέπει να γίνονται μόνον όταν τα αποτελέσματα της δοκιμής είναι συγκρατημένα ή άκρως θετικά.¹⁴ Προτείνεται ότι > 40 μονάδες GPL ή MPL να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων θετική ΣΕΔ καμία σχέση με τις APS και μέτρια σε υψηλούς ΣΕΔ που σχετίζεται με κλινικές εκδηλώσεις της APS.¹⁹

Βαθμονομητής

Οι Έτοιμοι προς Χρήση Βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να παρέχουν ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε εκτέλεση. Δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων μπορούν να δώσουν τιμές απορροφητικότητας μεγαλύτερες από εκείνη του Βαθμονομητή Α. Για τον προσδιορισμό ακριβών ημι-ποσοτικών τιμών, αυτά τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται περαιτέρω ώστε να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης του βαθμονομητή όταν επανεξετάζονται. Για τον προσδιορισμό τιμών U/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που αποκτήθηκαν με τον διαλύτη.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία Immulisa™ ACA δεν θα πρέπει να εκτελείται σε αιμολυμένα, βακτηριδιακά επιμολυσμένα ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δειγμάτων ανθρώπινου ορού μόνον.

Συνιστάται έντονα η δοκιμασία και για τα τρία ισότυπα ACA. Η δοκιμή για ένα μόνο και όχι όλοι οι ισότυποι μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Περαιτέρω, δεν μπορεί να γίνει διάγνωση επί τη βάσει μόνον των αποτελεσμάτων ACA. Πρέπει να εξετάζονται τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών δοκιμών και κλινικών ευρημάτων. Όταν παρατηρείται μια αρνητική δοκιμή ACA παρουσία κλινικών ενδείξεων, ενδείκνυται δοκιμή αντιπηκτικού λύκου ή άλλη επιπρόσθετη δοκιμή. Τα ACA παρατηρούνται επίσης πρόσκαιρα σε μια ποικιλία από λοιμώδη νοσήματα. Στις περιπτώσεις αυτές, ασθενείς θετικοί σε ACA θα πρέπει να επανεξετάζονται μετά από κατάλληλο μεσολαβούν διάστημα.

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari al calibratore D sono considerati positivi.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare su carta millimetrata lineare-logaritmica l'assorbanza dal calibratore A fino al calibratore E rispetto alle loro concentrazioni. Tracciare le concentrazioni in U/ml (APL, GPL, MPL) sull'asse X rispetto all'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva interpolante punto per punto. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva in base ai valori di assorbanza corrispondenti. In alternativa, è possibile utilizzare una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si raccomanda di refertare i risultati semiquantitativi come "positivi", "negativi" o "indeterminati" con i valori delle unità in U/ml. In presenza di risultati indeterminati/borderline, ripetere il test e valutare unitamente ad altri metodi di laboratorio, come indicato nei **Limiti della procedura**.

Interpretazione

I valori di interpretazione sono stati determinati 64 donatori di sangue normali e campioni di controllo senza sindrome da antifosfolipidi. Come cut-off del dosaggio è stata fissata la media di questi soggetti normali più la DS ottimizzata (IgA = 3,5 DS, IgG = 3 DS, IgM = 3,5 DS) ed è stato assegnato un valore di 10 U/ml in base alle titolazioni degli standard di Harris. Le informazioni seguenti servono solo come guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i propri valori normali.

Valore ACA U/ml	Interpretazione
<15 APL, GPL o MPL	Negativo
15-22,5 APL, GPL o MPL	Indeterminato (borderline)
>22,5 APL, GPL o MPL	Positivo

La letteratura suggerisce che numerosi disturbi clinici non correlati alla sindrome da anticorpi antifosfolipidi possono presentare livelli positivi bassi degli anticorpi anticardiolipina. Di conseguenza, secondo le raccomandazioni dei ricercatori, la diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi deve essere emessa solo quando i risultati del test sono moderatamente o fortemente positivi.¹⁴ È suggerito che > 40 unità GPL o MPL essere impiegato per distinguere tra bassi livelli ACA positivi estranei APS e moderati ad alti livelli ACA associati con manifestazioni cliniche di APS.¹⁹

Calibratore

Il kit include calibratori pronti all'uso da usare in ogni sessione analitica per fornire una determinazione semiquantitativa. Campioni del paziente contenenti livelli anticorpali elevati possono fornire valori di assorbanza superiori a quello del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, questi campioni devono essere ulteriormente diluiti in modo da rientrare nell'intervallo della curva del calibratore alla ripetizione del test. Per determinare i valori U/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Il test Immulisa™ ACA non va eseguito su campioni macroscopicamente emolizzati, con contaminazione microbica o lipemici. Questo metodo deve essere utilizzato solo per testare campioni di siero umano.

Si raccomanda fortemente di testare tutti e tre gli isotipi di ACA. Il test per uno solo e non tutti gli isotipi può produrre risultati falsi negativi. Inoltre, non è possibile emettere una diagnosi in base al solo risultato degli ACA. Vanno considerati i risultati degli altri test di

IT

- Passaggio 5** Rimuovere i micropozzetti richiesti dalla busta e rimettere in frigorifero le strisce non utilizzate nella busta sigillata. Posizionare perfettamente i micropozzetti nel supporto aggiuntivo fornito.
- Passaggio 6** Pipettare **100 µl** dei calibratori pronti all'uso, dei controlli positivo e negativo e dei campioni del paziente diluiti (**1:101**) nei micropozzetti appropriati come indicato nella scheda del protocollo.
- Nota:** includere un pozzetto contenente **100 µl** del diluente per siero come reagente bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il reagente bianco.
- Passaggio 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.
- Passaggio 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ogni micropozzetto con tampone di lavaggio ricostituito. Gettare il fluido presente nei pozzetti capovolgendo questi ultimi e picchiettandone il fondo oppure aspirando il liquido contenuto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e picchiettare energicamente i pozzetti su salviette di carta assorbente. Per le lavatrici automatiche, programmare la macchina in base alle istruzioni del produttore.
- Passaggio 9** Pipettare **100 µl** di coniugato nei micropozzetti.
- Passaggio 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.
- Passaggio 11** Lavare tutti i micropozzetti come nel Passaggio 8.
- Passaggio 12** Pipettare **100 µl** di substrato enzimatico in ogni micropozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi del coniugato.
- Passaggio 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 minuti) a temperatura ambiente.
- Passaggio 14** Pipettare **100 µl** di soluzione di arresto in ogni micropozzetto utilizzando lo stesso ordine e gli stessi tempi del substrato enzimatico. Leggere valori di assorbanza entro 30 minuti dell'aggiunta della soluzione di arresto.
- Passaggio 15** Leggere l'assorbanza di ogni micropozzetto a **450 nm** utilizzando un lettore per micropiastre a lunghezza d'onda singola o doppia (450/630 nm) contro il reagente bianco impostato ad assorbanza zero.

Controllo di qualità

Inserire in ogni dosaggio i calibratori, i controlli positivo e negativo e il reagente bianco per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza per il reagente bianco deve essere <0,3. Il calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve essere <10 U/ml (<10 APL, GPL o MPL). Se il test viene eseguito in duplicato, utilizzare la media di due letture per determinare le unità. Durante l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del Calibratore D deve essere superiore a quella del Controllo negativo e inferiore all'assorbanza del Controllo positivo. Per le determinazioni semiquantitative, il controllo positivo deve fornire valori compresi nell'intervallo dichiarato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere stabilite con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. del campione test
----- X Unità del calibratore D = Unità del campione test
Ass. del calibratore D

EL

Ασθενείς με επιβεβαιωμένη ενεργή ή οροθετική σύφιλη μπορεί να έχουν αυξημένα επίπεδα ACA. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα σύφιλης, θα πρέπει να εκτελούνται δοκιμές επιβεβαίωσης.

Τα αντισώματα αντικαρδιολιπίνης έχουν επίσης συσχετισθεί με νευρολογικά σύνδρομα, όπως παροδικά ισχαιμικά επακόλουθα και ημικρανία.¹³ Αντίθετα, σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, τα αντισώματα συνήθως επιμένουν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και μπορεί ακόμη και να προηγηθούν της εκδήλωσης των κλινικών συμπτωμάτων.²⁻⁴

ANAMENOMENES TIMEΣ

Η συχνότητα εμφάνισης ACA σε διάφορες περιστάσεις νόσου συνοψίζεται στους ακόλουθους πίνακες:

Περιστατικά ACA σε Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο ^{15,21-26}		
Αντισώματος Isotype	Εταιρείας % επίπτωση	APS % επίπτωση
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Κάθε isotype	53	71

Συσχετισμός Νόσου ACA^{24,27-31}

Πάθηση	% Περιστατικού
Υποτροπιάζουσα Φλεβική Θρόμβωση	28-71
Υποτροπιάζουσα Απώλεια Εμβρύου	28-64
Εγκάρσια μυελίτιδα	50
Αιμολυτική Αναιμία	38
Θρομβοπενία	27-33
Αρτηριακές Αποφράξεις	25-31
Δικτυωτή Περίλιση	25
Πνευμονική Υπέρταση	20-40

Σετ κλινικών δειγμάτων δοκιμάστηκαν στις μεθόδους Immulisa™ ACA ELISA. Τα αποτελέσματα που καταδεικνύουν επίπτωση στους πληθυσμούς για την μελέτη αυτή παρέχονται κατωτέρω:

Κατηγορία	IgA			IgG			IgM		
	n	Θετ	%	n	Θετ	%	n	Θετ	%
APS με άγνωστο καθεστώς ΣΕΔ	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
APS με συμμετοχή της Εταιρείας και η κατάσταση Άγνωστος ΣΕΔ	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Οροί που υποβάλλεται σε δοκιμή APS	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Οροί που υποβάλλεται σε δοκιμή Εταιρείας	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Thrombocytopenia	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Προεκλαμψία	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Άλλες ΕΝΙΣΧΥΣΕΙΣ *	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

* Άλλες αυτοάνοσες ασθένειες περιλαμβάνει δυσανεξία γλουτένης νόσου, μυοσίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, scleroderma, thyroiditis και χοριοεπιδερμικά ρήγματα

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα των ImmuLisTM Βελτιωμένη ACA ELISA αξιολογήθηκε με δοκιμή καλώς χαρακτηρισμένων δειγμάτων από υποκείμενα Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου θετικά σε καρδιολιπίνη μαζί με ελέγχους νόσων. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA. Μόνον δείγματα στο γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση της μεθόδου. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. ImmuLisTM Βελτιωμένη ACA ELISAs έναντι άλλων ACA ELISAs:

		Άλλο ACA IgA ELISA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	105	15	120
ACA	Αρνητικό	39	462	501
IgA ELISA	Σύνολο	144	477	621
Συμφωνία Θετικού Ποσοστού:		72,9% (95% CI 64,8% - 79,8%)		
Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού:		96,9% (95% CI 95,7% - 98,2%)		
Συμφωνία Γενικού ποσοστού:		93,3% (95% CI 88,7% - 93,3%)		

Ασθένεια που συνδέεται θέματα (APS, Εταιρείας, APS με Εταιρείας, ύποπτη APS και Εταιρείας): n = 432
Ελέγχους των νόσων: n = 189

		Άλλο ACA IgG ELISA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	155	32	187
ACA	Αρνητικό	25	467	492
IgG ELISA	Σύνολο	180	499	679
Συμφωνία Θετικού Ποσοστού:		86,1% (95% CI 80,0% - 90,6%)		
Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού:		93,6% (95% CI 91,0% - 95,5%)		
Συμφωνία Γενικού ποσοστού:		91,6% (95% CI 89,2% - 93,5%)		

Ασθένεια που συνδέεται θέματα (APS, Εταιρείας, APS με Εταιρείας, ύποπτη APS και Εταιρείας): n = 464
Ελέγχους των νόσων: n = 217

		Άλλο ACA IgM ELISA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	119	2	121
ACA	Αρνητικό	50	419	469
IgM ELISA	Σύνολο	169	421	590
Συμφωνία Θετικού Ποσοστού:		70,4% (95% CI 62,8% - 77,1%)		
Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού:		99,5% (95% CI 98,1% - 99,9%)		
Συμφωνία Γενικού ποσοστού:		91,2% (95% CI 88,5% - 93,3%)		

Ασθένεια που συνδέεται θέματα (APS, Εταιρείας, APS με Εταιρείας, ύποπτη APS και Εταιρείας): n = 408
Ελέγχους των νόσων: n = 182

B. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα: Σύνολα από δείγματα με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές εξετάστηκαν για αντισώματα ACA χρησιμοποιώντας τα συστήματα ImmuLisTM Βελτιωμένη ACA ELISAs.

Προϋπόθεση	IgA n	Θετ	% Θετ	IgG n	Θετ	% Θετ	IgM n	Θετ	% Θετ
Δυσανεξία γλουτένης νόσου	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
MCTD	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Μυοσίτιδα	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Ρευματοειδή αρθρίτιδα	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
Σύνδρομο Sjögren	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Σύφιλη	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Συστημική σκλήρυνση	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%

congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

PROCEDURA

Note sulla procedura

- Prima di iniziare il dosaggio, leggere attentamente il foglio illustrativo del prodotto.
- Prima di avviare la procedura del test, attendere che i campioni del paziente e i reagenti del test raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente. Immediatamente dopo l'uso, rimettere in frigorifero tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
- Rimuovere le strisce di micropozzetti necessarie dalla busta e risigillare accuratamente quest'ultima per evitare la formazione di condensa nei pozzetti non utilizzati. Rimettere immediatamente la busta in frigorifero.
- Tutte le diluizioni dei campioni del paziente vanno preparate prima di iniziare il dosaggio.
- **È fondamentale una tecnica di lavaggio valida.** Se il lavaggio viene effettuato manualmente, è adeguato se viene eseguito dirigendo sull'intera micropiastra un energico getto di tampone di lavaggio prodotto con una boccetta di lavaggio a bocca larga. **Si raccomanda l'uso di una lavatrice automatica per micropiastre.**
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di gestire 8 o 12 pozzetti allo stesso tempo. Questo strumento accelera il lavoro e fornisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutti i passaggi è importante controllare accuratamente i tempi. L'inizio di tutti i periodi di incubazione corrisponde al completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e dei reagenti deve avvenire alla stessa velocità e con la stessa sequenza.

Metodo del test

- Passaggio 1** Lasciar equilibrare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente.
- Passaggio 2** Etichettare la scheda del protocollo per indicare l'inserimento del campione nei pozzetti. La buona pratica di laboratorio richiede l'analisi dei campioni in duplicato.
- Passaggio 3** Per una **determinazione qualitativa** utilizzare solo il Calibratore D (*flacone con tappo giallo*).
- oppure**
- Per una **determinazione semiquantitativa** utilizzare i calibratori da A fino a E come illustrato nel seguente schema esemplificativo.

Qualitativa				Semiquantitativa			
A	Bianco	S5	Ecc.	A	Bianco	S1	Ecc.
B	Controllo	S6		B	Controllo	S2	
C	Controllo	S7		C	Controllo	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Passaggio 4 Preparare una diluizione **1:101** dei campioni del paziente mescolando **5 µl** dei sieri del paziente con **500 µl** di diluente per siero.

IT

		[REF] 5118G. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 15 ml	[IgM-CONJ HRP]	Coniugato HRP di montone anti-IgM umane per [REF] 5118M. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluente per siero. Pronto per l'uso.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce.
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Soluzione di arresto. Pronta per l'uso.
2 flacone	[BUF WASH]	Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.
1 x		Schede del protocollo
Componenti facoltativi		
1 x 60 ml	[BUF WASH]	Tampone di lavaggio concentrato liquido. Ricostituire a un litro.

Simboli utilizzati sulle etichette

[LOT]	Numero di lotto
[REF]	Numero di catalogo
[IVD]	Uso diagnostico in vitro
	Utilizzare entro
	Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Sufficiente per
	Fabbricante

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata o distillata
- Boccetta comprimibile per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di erogazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso per pipette
- Provette sterili 12 x 75 mm e relativa rastrelliera
- Contaminuti
- Salviette di carta assorbente
- Lettore per micropiastre capace di leggere i valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatrice automatica per micropiastre capace di erogare 200 µl

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

In questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il

EL

Thyroiditis	8	0	0,0%		8	0	0,0%		7	0	0,0%
-------------	---	---	------	--	---	---	------	--	---	---	------

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με 6 δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. Εκτελέσεις 6 πανομοιότυπων από κάθε δείγμα διεξήχθησαν σε 13 δοκιμασίες. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 12 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Δείγμα	Μέσος όρος (U/ml)	Ολική ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού Επαναληψιμότητα	
		SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

Αναπαραγωγιμότητα

90 πολλαπλότητας δοκιμών των δειγμάτων στην χαμηλή αρνητική περιοχή, κοντά της αποκοπής, στην περιοχή μέτρια θετική, και περίπου +/-20% των cutoffs ο ποσοτικός προσδιορισμός για κάθε ΣΕΔ isotype ασκούσε για τον καθορισμό ποιοτικών αναπαραγωγιμότητας. Ποσοτικός προσδιορισμός αποτελεσμάτων για χαμηλή αρνητικά και μέτρια θετικά δείγματα παράγονται ποιοτικά συμφωνία 100%. + 20% δείγματα που παράγονται 98% (IgA), 99% (IgG) και 98% (IgM) ποιοτική συμφωνία. Κατά προσέγγιση αποκοπής δείγματα που παράγονται 52% (IgA), 60% (IgG) και 60% (IgM) ποιοτική συμφωνία. -20% δείγματα που παράγονται 99% (IgA), 100% (IgG) και 97% (IgM) ποιοτική συμφωνία.

Όριο Ανίχνευσης

Τα όρια ανίχνευσης (LoD) για αντισώματα ACA επί τη βάσει 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από of 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS) καθορίστηκαν να είναι: IgA 1,8 APL, IgG 0,6 GPL, και IgM 2,8 MPL.

Γραμμικότητα και Ανάκαμψη

Εκτελέστηκαν μελέτες με τη χρήση ισαπέχουσας αραιώσης σειράς θετικών δειγμάτων με τιμές σε όλο το εύρος του βαθμονομητή για να προσδιορίσει το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας. Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας προσδιορίστηκε ότι θα είναι: IgA 1,8 σε 120 APL, IgG 1,0 σε 120 GPL και IgM 2,8 σε 120 MPL. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω. Συνιστάται τα δείγματα που παράγουν αποτελέσματα μεγαλύτερα από τον κορυφαίο βαθμονομητή να αραιώνονται και επανεξετάζονται για ακριβή ημι-ποσοτικά αποτελέσματα.

EL

IgA	Εύρος Δοκιμής (APL)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% Ανάκαμψη (Επιτευχθείσα/Αναμενόμενη)
	2,6 έως 47,6	0,999 (0,95 έως 1,05)	-0,52 (-1,95 έως 09,91)	1	97,7% έως 114,0%
	18,4 έως 70,4	0,997 (0,85 έως 1,15)	1,57 (-5,28 έως 8,43)	0,99	84,4% έως 100%
	20,0 έως 107,6	1,126 (1,00 έως 1,26)	0,07 (-9,49 έως 9,62)	0,99	84,4% έως 100%
IgG	Εύρος Δοκιμής (GPL)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% Ανάκαμψη (Επιτευχθείσα/Αναμενόμενη)
	4,5 έως 27,8	0,995 (0,94 έως 1,05)	0,35 (-0,66 έως 1,35)	1	90,8% έως 101,1%
	2,4 έως 98,1	0,989 (0,90 έως 1,08)	-0,73 (-6,11 έως 4,66)	0,99	95,9% έως 114,6%
	3,1 έως 107,5	1,168 (0,94 έως 1,40)	-4,73 (-20,64 έως 11,17)	0,97	82,6% έως 102,8%
IgM	Εύρος Δοκιμής (MPL)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% Ανάκαμψη (Επιτευχθείσα/Αναμενόμενη)
	5,6 έως 28,3	0,925 (0,83 έως 1,02)	1,70 (-0,05 έως 3,44)	0,99	83,0% έως 102,3%
	5,8 έως 86,8	0,97 (0,87 έως 1,07)	1,16 (-4,37 έως 6,69)	0,99	93,4% έως 106,9%
	5,5 έως 103,6	0,939 (0,76 έως 1,11)	4,78 (-5,89 έως 15,46)	0,99	81,6% έως 105,2%

Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα ACA για κάθε ισότυπο με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml), Τριγλυκερίδια (37 mmol/L), και Χοληστερόλη (13 mmol/L).

IT

Materiali forniti

ACA IgA ELISA
ACA IgG ELISA
ACA IgM ELISA

REF 5118A
REF 5118G
REF 5118M

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

12 x 8

MICROPLATE|ACA

Micropiastra con micropozzetti separabili singolarmente. Rivestimento con antigene anticardiolipina B2GP1 bovina o umana. Pronta per l'uso.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-A

Controllo positivo (tappo rosso), pronto per l'uso per **REF** 5118A. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi IgA anticardiolipina. L'intervallo di concentrazione previsto in APL è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-G

Controllo positivo (tappo rosso), pronto per l'uso per **REF** 5118G. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi IgG anticardiolipina. L'intervallo di concentrazione previsto in GPL è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|+|ACA-M

Controllo positivo (tappo rosso), pronto per l'uso per **REF** 5118M. Contiene siero umano positivo per gli anticorpi IgM anticardiolipina. L'intervallo di concentrazione previsto in MPL è stampato sull'etichetta.

1 x 1.75 ml

CONTROL|-

Controllo negativo, pronto per l'uso (*tappo bianco*). Contiene siero umano.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-A
CALIBRATOR|B|ACA-A
CALIBRATOR|C|ACA-A
CALIBRATOR|D|ACA-A
CALIBRATOR|E|ACA-A

Serie di 5 calibratori pronti per l'uso per **REF** 5118A. Calibratore A (tappo verde) 120 APL, calibratore B (tappo viola) 60 APL, calibratore C (tappo blu) 30 APL, calibratore D (tappo giallo) 15 APL e calibratore E (tappo arancione) 1 APL. Derivato da siero umano contenente IgA ACA. Le concentrazioni in APL sono stampate sulle etichette.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-G
CALIBRATOR|B|ACA-G
CALIBRATOR|C|ACA-G
CALIBRATOR|D|ACA-G
CALIBRATOR|E|ACA-G

Serie di 5 calibratori pronti per l'uso per **REF** 5118G. Calibratore A (tappo verde) 120 GPL, calibratore B (tappo viola) 60 GPL, calibratore C (tappo blu) 30 GPL, calibratore D (tappo giallo) 15 GPL e calibratore E (tappo arancione) 1 GPL. Derivato da siero umano contenente IgG ACA. Le concentrazioni in GPL sono stampate sulle etichette.

5 x 1.75 ml

CALIBRATOR|A|ACA-M
CALIBRATOR|B|ACA-M
CALIBRATOR|C|ACA-M
CALIBRATOR|D|ACA-M
CALIBRATOR|E|ACA-M

Serie di 5 calibratori pronti per l'uso per **REF** 5118M. Calibratore A (tappo verde) 120 MPL, calibratore B (tappo viola) 60 MPL, calibratore C (tappo blu) 30 MPL, calibratore D (tappo giallo) 15 MPL e calibratore E (tappo arancione) 1 MPL. Derivato da siero umano contenente IgM ACA. Le concentrazioni in MPL sono stampate sulle etichette.

1 x 15 ml

IgA-CONJ|HRP

Coniugato HRP di montone anti-IgA umane per **REF** 5118A. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.

1 x 15 ml

IgG-CONJ|HRP

Coniugato HRP di montone anti-IgG umane per

IT

Gli anticorpi anticardiolipina delle classi IgG e IgA sembrano essere più strettamente associati alla sindrome da antifosfolipidi rispetto agli anticorpi della classe IgM. Tuttavia, gli anticorpi IgM sembrano essere maggiormente influenzati dal trattamento.^{5,10} Bassi livelli di anticorpi IgM possono essere identificati in altre malattie autoimmuni come ad esempio artrite reumatoide, sindrome di Sjögren primaria, lupus eritematoso iatrogeno, malattia di Lyme e sifilide.^{8,10} I calibratori e il controllo positivo utilizzati nel kit sono stati standardizzati contro gli standard di calibrazione di Harris dell'Antiphospholipid Standardization Laboratory.¹⁷

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'antigene cardiolipina viene legato ai pozzetti di una piastra a micropozzetti in polistirene, cui segue il blocco dei siti che non hanno reagito per ridurre il legame non specifico. A ogni pozzetto separato vengono aggiunti controlli, calibratori e sieri del paziente, consentendo agli anticorpi anticardiolipina presenti di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene rimosso mediante lavaggio e ad ogni pozzetto viene aggiunto un coniugato anti-IgG, anti-IgA o anti-IgM umane marcato con enzima. Questi anticorpi coniugati con enzima si legano specificamente all'immunoglobulina umana della classe appropriata. Dopo la rimozione mediante lavaggio di tutto il coniugato non legato, viene aggiunto ai pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB). Dopo l'arresto della reazione enzimatica, l'intensità della variazione cromatica, che è proporzionale alla concentrazione anticorpale, viene letta con uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità per millilitro (U/ml) secondo la classificazione di Harris. Le unità per le IgG sono espresse come GPL, per le IgM sono espresse come MPL e per le IgA come APL.

REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Le strisce di micropozzetti rivestiti sono monouso. Le strisce di micropozzetti non utilizzate devono essere sigillate accuratamente in buste contenenti essiccanti per impedire la formazione di condensa e conservati a 2-8 °C.

Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I e sono risultati negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.¹⁷

La soluzione di arresto è costituita da acido solforico diluito. L'acido solforico (H₂SO₄) è velenoso e corrosivo. Non ingerire ed evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare l'esposizione a basi, metalli o altri composti che potrebbero reagire con gli acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante che può essere nocivo se inalato, ingerito o assorbito attraverso la pelle. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle e con gli occhi.

Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit. Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

ES



ImmuLisa Enhanced™

Anticuerpo cardiolipina (ACA) ELISAs

Cardiolipina/fosfolípido IgA, IgG o IgM anticuerpos ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF	5118A	ACA IgA ELISA	96 Determinaciones
REF	5118G	ACA IgG ELISA	96 Determinaciones
REF	5118M	ACA IgM ELISA	96 Determinaciones

UTILIZACIÓN PREVISTA

ImmuLisa™ cardiolipina IgA anticuerpos (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de cardiolipina IgA anticuerpos en el suero humano para ayudar en el diagnóstico de Síndrome antifosfolípido (APS) y APS asociado con lupus eritematoso sistémico (les) junto con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

ImmuLisa™ cardiolipina IgG anticuerpo (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de cardiolipina IgG en suero humano para ayudar en el diagnóstico de Síndrome antifosfolípido (APS) y APS asociado con lupus eritematoso sistémico (les) junto con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

ImmuLisa™ cardiolipina IgM anticuerpo (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de cardiolipina IgM anticuerpos en suero humano para ayudar en el diagnóstico de Síndrome antifosfolípido (APS) y APS asociado con lupus eritematoso sistémico (les) junto con otras pruebas de laboratorio y hallazgos clínicos.

ADVERTENCIA: Los pacientes confirmados de sífilis activa o seropositivos pueden tener elevado los niveles de anticuerpos (ACA) de anti-cardiolipina. Para descartar sífilis, deben realizarse pruebas de confirmación.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos antifosfolípidos son un grupo heterogéneo de anticuerpos contra fosfolípidos con carga negativa.¹ Se detectan principalmente a través del análisis de anticuerpos anticardiolípidos (ACA), el análisis de falso positivo biológico para sífilis y el análisis de anticoagulante lúpico. Estos tres análisis detectan anticuerpos relacionados, aunque no necesariamente idénticos. Así, en ocasiones es necesario realizar más de uno de estos análisis para identificar los anticuerpos antifosfolípidos. El formato del ensayo ELISA es un método muy sensible para la detección de anticuerpos antifosfolípidos.²

La presencia de anticuerpos anticardiolipina ayuda a identificar a aquellos pacientes con riesgo de sufrir una trombosis venosa o arterial a menudo acompañada de trombocitopenia, un síndrome también llamado síndrome antifosfolípido.¹⁻¹² El síndrome antifosfolípido ocurre más frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o enfermedades similares al lupus cuando no se cumplen los criterios del LES.⁵⁻⁷ Se dan unos niveles altos de anticuerpos anticardiolipina con la trombosis, pérdida fetal, trombocitopenia y otras enfermedades.¹⁻¹⁵ Se dan unos niveles bajos de anticuerpos anticardiolipina en pacientes con variedad de enfermedades clínicas no relacionadas con el síndrome antifosfolípido. Así pues, la existencia de unos niveles bajos de estos anticuerpos no tiene mucha importancia.

ES

Los anticuerpos anticardiolipina de clase IgG e IgA parecen más relacionados con el síndrome antifosfolípido que los anticuerpos de clase IgM. Sin embargo, los anticuerpos IgM parecen más afectados por el tratamiento.^{5,10} Se pueden identificar unos niveles bajos de anticuerpos IgM en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso inducido por fármacos, la enfermedad de Lyme, y la sífilis.^{8,10} Los calibradores y el control positivo utilizados en el equipo han sido estandarizados en base a las normativas de calibración de Harris emitidas por el Laboratorio de Estandarización de Antifosfolípidos.¹⁷

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno de cardiolipina se une a los pocillos de una placa con micropocillos y a continuación se recubren las partes sin reacción para reducir las uniones no específicas. Se añaden controles, calibradores y suero del paciente diluido a pocillos diferentes, lo cual permite a los anticuerpos de cardiolipina presentes unirse al antígeno inmovilizado. La muestra no ligada es lavada y se añade una enzima etiquetada como conjugado IgG, IgA o IgM antihumano a cada uno de los pocillos. Estos anticuerpos conjugados con enzimas se unen específicamente a la inmunoglobulina humana del tipo adecuado. Después de lavar el conjugado no unido, se añade a los pocillos sustrato de encima específica (TMB). Tras detener la reacción enzimática, la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, es leída por un espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades por milímetro (U/ml) de acuerdo con la clasificación de Harris. Las unidades por IgG se expresan como GPL, para IgM como MPL y para IgA como APL.

REACTIVOS

Guarde todos los reactivos a entre 2 y 8°C. **No los congele.** Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se los maneja y almacena de acuerdo con estas instrucciones.

No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su utilización.

Reconstituya el tampón de lavado hasta un litro con agua destilada o desionizada. Si lo guarda entre 2 y 8°C, el tampón de lavado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad del equipo.

Las tiras de micropocillos recubiertos son de un solo uso. Las tiras de micropocillos no utilizadas deberían ser recolocadas con cuidado en la bolsa con desecantes para evitar la condensación y ser almacenadas a 2-8°C.

Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.¹⁷

La solución de parada es una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es venenoso y corrosivo. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite exponerlo a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con ácidos.

El sustrato de enzima TMB contiene un irritante que puede resultar nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. No lo ingiera y evite el contacto con la piel y los ojos.

Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos. No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

IT



ImmuLISA Enhanced™

Anticorpi cardiolipina (ACA) ELISA

Cardiolipina/fosfolipide IgA, IgG o IgM anticorpi ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

REF	5118A	ACA IgA ELISA	96 determinazioni
REF	5118G	ACA IgG ELISA	96 determinazioni
REF	5118M	ACA IgM ELISA	96 determinazioni

USO PREVISTO

ImmuLISA Enhanced™ cardiolipina IgA anticorpi (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa degli anticorpi anticardiolipina IgA nel siero umano per aiutare nella diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) e APS associati con lupus eritematoso sistemico (LES) in combinazione con altri test di laboratorio e clinici.

ImmuLISA Enhanced™ cardiolipina IgG anticorpi (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa degli anticorpi anticardiolipina IgG nel siero umano per aiutare nella diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) e APS associati con lupus eritematoso sistemico (LES) in combinazione con altri test di laboratorio e clinici.

ImmuLISA Enhanced™ cardiolipina IgM anticorpi (ACA) ELISA: Enzyme linked immunoassay (ELISA) per la rilevazione qualitativa o semi-quantitativa degli anticorpi anticardiolipina IgM nel siero umano per aiutare nella diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) e APS associati con lupus eritematoso sistemico (LES) in combinazione con altri test di laboratorio e clinici.

Attenzione: Sifilide attiva o sieropositivi confermati pazienti possono elevati livelli di anticardiolipina (ACA) di anticorpo. Per escludere la sifilide, test di conferma deve essere eseguita.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi antifosfolipidi sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro i fosfolipidi a carica negativa.¹ Essi vengono rilevati principalmente con il test degli anticorpi anticardiolipina (ACA), il test dei falsi positivi biologici per la sifilide e il test per il lupus anticoagulante. Questi tre test rilevano anticorpi correlati, ma non necessariamente identici. Per questa ragione, è talvolta necessario più di un test per identificare gli anticorpi antifosfolipidi. Il dosaggio ELISA è un metodo molto sensibile per il rilevamento degli anticorpi antifosfolipidi.⁴

La presenza di anticorpi anticardiolipina aiuta a identificare pazienti a rischio di trombosi venosa e/o arteriosa spesso accompagnata da trombocitopenia, una sindrome chiamata sindrome da antifosfolipidi.¹⁻¹² La sindrome da antifosfolipidi si verifica più spesso nei pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) o con malattia lupus-simile dove i criteri per il LES non sono soddisfatti.⁵⁻⁷ Livelli elevati degli anticorpi anticardiolipina sono presenti nei casi di trombosi, perdita fetale, trombocitopenia e numerosi altri disturbi.¹⁻¹⁵ Bassi livelli degli anticorpi anticardiolipina sono presenti in una varietà di disturbi clinici che non sono correlati alla sindrome da antifosfolipidi. Per questa ragione, bassi livelli di questi anticorpi hanno un significato limitato.

FR

Reproductibilité

90 réplicats d'échantillons dans la plage négative faible, près de la fréquence de coupure, dans la plage positive modérée et environ +/-20 % des seuils de dosage pour chaque isotype ACA ont été effectuées pour déterminer la reproductibilité qualitative. Résultats d'analyse pour des échantillons positifs négatifs et modérés faibles produit 100 % d'accord qualitatif. + spécimens de 20 % produisent 98 % (IgA), 99 % (IgG) et 98 % (IgM) accord qualitatif. Spécimens de démarcation approximatives produisent 52 % (IgA), 60 % (IgG) et 60 % (IgM) accord qualitatif. -20 % des spécimens produisent 99 % (IgA), 100 % (IgG) et 97 % (IgM) accord qualitatif.

Limite de détection

La limite de détection (LoD) pour les anticorps ACA a été déterminée à partir de 60 mesures d'échantillons vierges et 10 mesures de chacun des 6 échantillons avec des niveaux bas (NHS) et correspond aux valeurs suivantes : IgA 1,8 APL, IgG 0,6 GPL, et IgM 2,8 MPL.

Linéarité et rétablissement

Des études ont été menées en utilisant des séries de dilution équidistantes d'échantillons positifs avec des valeurs comprises tout au long de l'éventail des calibres afin de déterminer l'étendue linéaire de l'analyse. L'étendue linéaire de l'analyse a été déterminée et correspond aux valeurs suivantes : IgA 1,8 à 120 APL, IgG 1,0 à 120 GPL et IgM 2,8 à 120 MPL. Les résultats sont résumés ci-dessous. Il est suggéré que les échantillons produisant des résultats supérieurs aux plus hauts calibres soient dilués et testés de nouveau pour obtenir des résultats semi quantitatifs exacts.

IgA	Étendue du Test (APL)	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y (95% CI)	R ²	% de récupération (Obtenu/Attendu)
	2,6 à 47,6	0,999 (0,95 à 1,05)	-0,52 (-1,95 à 9,91)	1	97,7% à 114,0%
	18,4 à 70,4	0,997 (0,85 à 1,15)	1,57 (-5,28 à 8,43)	0,98	85,1% à 101,9%
	20,0 à 107,6	1,126 (1,0 à 1,26)	0,07 (-9,49 à 9,62)	0,99	84,4% à 100%
IgG	Étendue du Test (GPL)	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y (95% CI)	R ²	% de récupération (Obtenu/Attendu)
	4,5 à 27,8	0,995 (0,94 à 1,05)	0,35 (-0,66 à 1,35)	1	90,8% à 101,1%
	2,4 à 98,1	0,989 (0,90 à 1,08)	-0,73 (-6,11 à 4,66)	0,99	95,9% à 114,6%
	3,1 à 107,5	1,168 (0,94 à 1,40)	-4,73 (-20,64 à 11,17)	0,97	82,6% à 102,8%
IgM	Étendue du Test (MPL)	Pente (95% CI)	Segment sur l'axe Y (95% CI)	R ²	% de récupération (Obtenu/Attendu)
	5,6 à 28,3	0,925 (0,83 à 1,02)	1,70 (-0,05 à 3,44)	0,99	83,0% à 102,3%
	5,8 à 86,8	0,97 (0,87 à 1,07)	1,16 (-4,37 à 6,69)	0,99	93,4% à 106,9%
	5,5 à 103,6	0,939 (0,76 à 1,11)	4,78 (-5,89 à 15,46)	0,99	81,6% à 105,2%

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant le sérum avec des niveaux d'anticorps ACA connus pour chaque isotype avec des échantillons de sérum potentiellement interférant puis en étudiant la déviation par rapport aux résultats escomptés. Aucune interférence significative n'a été démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : Hémoglobine (2 g/L), Bilirubine (342 µmol/L), Facteur rhumatoïde (100 EU/ml), Triglycérides (37 mmol/L), et Cholestérol (13 mmol/L).

ES

Materiales proporcionados

ACA IgA ELISA
ACA IgG ELISA
ACA IgM ELISA

REF 5118A
REF 5118G
REF 5118M

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8 MICROPLATE|ACA

Microplaca con micropocillos individuales escindibles bovino o humano B2GP1. Revestida con antígeno de cardiolipina. Lista para su utilización.

1 x 1.75 ml CONTROL+|ACA-A

Control Positivo listo para su utilización (tapón rojo) para REF 5118A. Contiene suero humano positivo en anticuerpos anticardiolipina IgA. El registro de concentración esperado en APL está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml CONTROL+|ACA-G

Control Positivo listo para su utilización (tapón rojo) para REF 5118G. Contiene suero humano positivo en anticuerpos anticardiolipina IgG. El registro de concentración esperado en GPL está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml CONTROL+|ACA-M

Control Positivo listo para su utilización (tapón rojo) para REF 5118M. Contiene suero humano positivo en anticuerpos anticardiolipina IgM. El registro de concentración esperado en MPL está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml CONTROL-

Control Negativo listo para su utilización (tapón blanco). Contiene suero humano.

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|ACA-A
CALIBRATOR|B|ACA-A
CALIBRATOR|C|ACA-A
CALIBRATOR|D|ACA-A
CALIBRATOR|E|ACA-A

Juego de 5 calibradores listos para su utilización para REF 5118A. Calibrador A (tapón verde) 120 APL, Calibrador B (tapón violeta) 60 APL, Calibrador C (tapón azul) 30 APL, Calibrador D (tapón amarillo) 15 APL, y Calibrador E (tapón naranja) 1 APL. Provenientes de suero humano con ACA IgA. Las concentraciones en APL están impresas en las etiquetas.

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|ACA-G
CALIBRATOR|B|ACA-G
CALIBRATOR|C|ACA-G
CALIBRATOR|D|ACA-G
CALIBRATOR|E|ACA-G

Juego de 5 calibradores listos para su utilización para REF 5118G. Calibrador A (tapón verde) 120 GPL, Calibrador B (tapón violeta) 60 GPL, Calibrador C (tapón azul) 30 GPL, Calibrador D (tapón amarillo) 15 GPL, y Calibrador E (tapón naranja) 1 GPL. Provenientes de suero humano con ACA IgG. Las concentraciones en GPL están impresas en las etiquetas.

5 x 1.75 ml CALIBRATOR|A|ACA-M
CALIBRATOR|B|ACA-M
CALIBRATOR|C|ACA-M
CALIBRATOR|D|ACA-M
CALIBRATOR|E|ACA-M

Juego de 5 calibradores listos para su utilización para REF 5118M. Calibrador A (tapón verde) 120 MPL, Calibrador B (tapón violeta) 60 MPL, Calibrador C (tapón azul) 30 MPL, Calibrador D (tapón amarillo) 15 MPL, y Calibrador E (tapón naranja) 1 MPL. Provenientes de suero humano con ACA IgM. Las concentraciones en MPL están impresas en las etiquetas.

1 x 15 ml IgA-CONJ|HRP

Conjugado HRP antihumano de cabra IgA para REF 5118A. Listo para su utilización. De color rosa.

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

Conjugado HRP antihumano de cabra IgG para

ES

		[REF] 5118G. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 15 ml	[IgM-CONJ HRP]	Conjugado HRP antihumano de cabra IgM para [REF] 5118M. Listo para su utilización. De color rosa.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluyente de suero. Listo para su utilización.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Sustrato de enzima TMB. Listo para su utilización. Proteger de la luz.
1 x 15 ml	[STOP H2SO4]	Solución de parada. Lista para su utilización.
2 x vials	[BUF WASH]	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir a un litro cada uno.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60ml	[BUF WASH]	Tampón de lavado líquido concentrado. Reconstituir a un litro.
-----------------	-------------------	---

Símbolos utilizados en las etiquetas

[LOT]	Número de lote
[REF]	Número de catálogo
[IVD]	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Leer las instrucciones antes de utilizar
	Número de análisis
	Fabricante

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella de plástico blando para el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar de 5 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Tubos de ensayo limpios de 12 x 75 mm y rejilla para tubos de ensayo
- Temporizador
- Toallitas de papel absorbentes
- Lector de microplaca capaz de leer valores de absorbencia a 450 nm. Si está disponible el lector de microplaca de longitud de onda dual, el filtro de referencia debería fijarse a 600-650 nm
- Lavador de microplaca automático capaz de suministrar 200 µl

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2° y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las

FR

		Autres ELISA ACA IgM		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	119	2	121
ACA	Négatif	50	419	469
IgM ELISA	Total	169	421	590
Concordance en pourcentage cas positifs :		70,4% (95% CI 62,8% - 77,1%)		
Concordance en pourcentage cas négatifs :		99,5% (95% CI 98,1% - 99,9%)		
Concordance en pourcentage tous les cas :		91,2% (95% CI 88,5% - 93,3%)		
Maladie associés sujets (APS, SLE, APS avec SLE, soupçonnés APS et SLE): n = 408				
Contrôle de la maladie: n = 182				

B. Réactivité Croisée : Des groupes de spécimens ayant un potentiel de réactivité croisée provenant d'individus atteints d'autres dysfonctionnements auto-immunitaires ont été testés en utilisant Immulisa™ ACA ELISA.

Condition	IgA n	Pos	% Pos	IgG n	Pos	% Pos	IgM n	Pos	% Pos
Maladie coeliaque	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
MCTD	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Myosite	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Polyarthrite rhumatoïde	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
Syndrome Sjögren	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Syphilis	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Sclérodermie systémique	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%
Thyroidite	8	0	0,0%	8	0	0,0%	7	0	0,0%

Précision

La précision a été testée avec 6 spécimens sélectionnés a travers l'échantillon utilisé pour l'analyse. L'exécution de 6répliques de chaque spécimen a été conduite dans 13 essais. La reproductibilité a été déterminée à l'aide de 12 répliques de chaque spécimen.

		Imprécision totale		Entre les jours		En cours d'exécution (Reproductibilité)	
Échantillon	Moyenne (U/ml)	Écart-type (U/ml)	CV%	Écart-type (U/ml)	CV%	Écart-type (U/ml)	CV%
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

FR

Des ensembles d'échantillons cliniques ont été testés à l'aide d'ELISA Immulisa™ ACA. Les résultats démontrant l'incidence chez les populations pour cette étude sont fournis ci-dessous.

Catégorie	IgA			IgG			IgM		
	n	pos	%	n	pos	%	n	pos	%
APS avec statut inconnu d'ACA	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
Points d'accès et la participation de SLE									
et statut inconnu d'ACA	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Sérums soumis à des essais d'APS	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
Lupus érythémateux disséminé	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Sérums soumis à des essais de SLE	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Thrombocytopénie	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Prééclampsie	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Autres aides*	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

* Autre maladie auto-immune comprend la maladie coeliaque, myosite, polyarthrite rhumatoïde, sclérodémie, thyroïdite et vascularite

CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de la solution Immulisa™ ACA ELISA a été évaluée en testant des spécimens bien caractérisés provenant de sujets atteints de LED avec des résultats cardiolipides positifs. Ces spécimens ont également été testés avec des kits ELISA disponibles dans le commerce. Seuls les spécimens dans l'éventail linéaire de l'analyse ont été utilisés dans la méthode de comparaison. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. ELISA Immulisa™ ACA contre d'autres ELISA ACA :

Autres ELISA ACA IgA				
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	105	15	120
ACA	Négatif	39	462	501
IgA ELISA	Total	144	477	621
Concordance en pourcentage cas positifs :				
72,9% (95% CI 64,8% - 79,8%)				
Concordance en pourcentage cas négatifs :				
96,9% (95% CI 95,7% - 98,2%)				
Concordance en pourcentage tous les cas :				
91,3% (95% CI 88,7% - 93,3%)				

Maladie associés sujets (APS, SLE, APS avec SLE, soupçonnés APS et SLE): n = 432

Contrôle de la maladie: n = 189

Autres ELISA ACA IgG				
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	155	32	187
ACA	Négatif	25	467	492
IgG ELISA	Total	180	499	679
Concordance en pourcentage cas positifs :				
86,1% (95% CI 80,0% - 90,6%)				
Concordance en pourcentage cas négatifs :				
93,6% (95% CI 91,0% - 95,5%)				
Concordance en pourcentage tous les cas :				
91,6% (95% CI 89,2% - 93,5%)				

Maladie associés sujets (APS, SLE, APS avec SLE, soupçonnés APS et SLE): n = 464

Contrôle de la maladie: n = 217

ES

muestras repetidamente. Es recomendable que los especímenes congelados sean analizados al cabo de un año.

PROCEDIMIENTO

Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de empezar el ensayo.
- Deje que los especímenes del paciente y los reactivos de los análisis se adapten a la temperatura ambiente antes de empezar con el procedimiento de análisis. Vuelva a meter todos los especímenes y reactivos no utilizados en la nevera después de su utilización.
- Saque las tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y vuelva a cerrarla cuidadosamente para evitar la condensación de los pocillos no utilizados. Vuelva a meter la bolsa a la nevera inmediatamente.
- Todas las diluciones de las muestras del paciente deberían prepararse antes de empezar con el ensayo.
- **Una buena técnica de lavado es fundamental.** Si el lavado va a ser realizado a mano, aplique una corriente fuerte de tampón de lavado con una botella de lavado de boca ancha por toda la microplaca. **Se recomienda utilizar un lavador de microplacas automático.**
- Utilice una pipeta multicanal capaz de proveer a 8 a 12 pozos simultáneamente. Esto acelera el proceso y proporciona tiempos de incubación más uniformes.
- En todos los pasos es necesario controlar cuidadosamente el tiempo. El inicio de todos los periodos de incubación empieza al terminar de añadir el reactivo.
- Todas las muestras y reactivos deberían ser añadidos a la misma velocidad y en el mismo orden.

Método de análisis

Paso 1 Deje que los reactivos y especímenes se adapten a la temperatura ambiente.

Paso 2 Etiquete la hoja de protocolo para indicar que se han colocado muestras en los micropocillos. Una buena práctica de laboratorio es analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para una **determinación cualitativa** utilice únicamente el Calibrador D (*vial con tapón amarillo*).

O

Para una **determinación semi-cuantitativa** utilice los Calibradores A a E tal como aparece en el plan de muestras siguiente.

Cualitativa				Semi-cuantitativa			
A	Base	S5	Etc.	A	Base	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
P	S2	S10		P	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Paso 4 Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500 µl** de Diluyente de Suero.

ES

Paso 5 Saque los micropocillos necesarios de la bolsa y vuelva a meter en la nevera las tiras no utilizadas dentro de la bolsa cerrada. Coloque los micropocillos en la funda adicional proporcionada.

Paso 6 Vierta **100 µl** de Calibradores listos para usar, controles positivos y negativos y muestras del paciente diluidas (**1:101**) en los micropocillos adecuados en base a la hoja de protocolo.

Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** del Diluyente de Suero como reactivo base. Ajuste el medidor ELISA en función del reactivo base.

Paso 7 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lávelo **4x** con tampón de lavado. Para un lavado manual, llene cada micropocillo con tampón de lavado reconstituido. Deseche el fluido volcando y vertiendo el contenido de cada pocillo o aspirando el líquido de cada pocillo. Para secar el final del último lavado, vuelque las tiras y golpee los pocillos con fuerza con toallitas de papel absorbentes. Para lavadores automáticos, programe el lavador siguiendo las instrucciones del fabricante.

Paso 9 Vierta **100 µl** de Conjugado en los micropocillos.

Paso 10 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 11 Lave todos los micropocillos siguiendo las instrucciones del Paso 8.

Paso 12 Vierta **100 µl** de Sustrato de Enzimas en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Conjugado.

Paso 13 Incúbelo **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 14 Vierta **100 µl** de Solución de Parada en cada micropocillo con el mismo orden y tiempo que aplicó el Sustrato de Enzimas. Lea los valores de absorbencia a los **30 minutos** de añadir la Solución de Parada.

Paso 15 Lea la absorbencia de cada micropocillo a **450 nm** si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda simple o a 450/630nm si utiliza un lector de microplaca de longitud de onda dual con el reactivo base fijado a absorbencia cero.

Control de calidad

Los Calibradores, los Controles Positivo y Negativo y el reactivo base deben comprobarse en cada ensayo para verificar la integridad y la precisión del análisis. La medición de absorbencia del reactivo base debería ser <0,3. El Calibrador A debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 1,0, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser <10 U/ml (<10 APL, GPL o MPL). Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura. Al realizar determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. Para las determinaciones semicuantitativas el control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. muestra de análisis

----- X Unidades de Calibrador D = Unidades muestra de análisis
Abs. de Calibrador D

FR

différencier les faibles niveaux d'ACA positifs non reliés aux points d'accès et modérés à de fortes concentrations d'ACA associées aux manifestations cliniques de la APS.¹⁹

Calibreur

Les Calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir une détermination semi quantitative et doivent être utilisés à chaque série de test. Les échantillons de patient contenant des niveaux d'anticorps élevés peuvent donner des valeurs d'absorbances supérieures à celles du calibreur A. Afin de déterminer des valeurs semi quantitatives exactes, de tels spécimens doivent être dilués encore plus afin de rentrer dans l'éventail de la courbe du calibreur lorsqu'ils seront testés de nouveau. Pour déterminer les valeurs en U/ml, multipliez le nombre d'unités obtenues par le facteur de dilution.

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Le test ImmuLisa™ ACA ne doit pas être effectué sur des échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes. Cette méthode doit être utilisée pour tester des échantillons de sérum humain seulement.

Il est fortement recommandé d'effectuer le test pour les trois isotypes d'ACA. Si un seul isotype est testé ou qu'ils ne sont pas tous testés, cela peut entraîner des résultats qui sont faussement négatifs. De plus, un diagnostic ne peut être établi sur la seule base des résultats d'ACA. Les résultats d'autres tests laboratoires et d'analyses cliniques doivent être pris en considération. Lorsqu'un test ACA négatif est mené en présence d'indications cliniques, un test de lupus anticoagulant ou d'autres tests supplémentaires sont indiqués. Les ACA sont également observés de façon transitoire dans plusieurs maladies infectieuses. Dans ces cas-là, les patients positifs aux ACA doivent être retestés suivant un intervalle approprié. Les patients souffrant de syphilis latente ou active confirmée peuvent avoir des niveaux élevés d'ACA. Pour éliminer la possibilité d'une syphilis, des tests confirmatoires doivent être effectués.

Les anticorps anti-cardiolipides ont aussi été associés à des syndromes neurologiques tels que les accidents ischémiques transitoires ou les migraines.¹³ En revanche, chez les patients atteints du syndrome des anti-phospholipides, les anticorps persistent sur des périodes de temps plus longues et peuvent même précéder le déclenchement de symptômes cliniques.^{2,4}

VALEURS ATTENDUES

La présence d'ACA dans le cas de plusieurs états pathologiques est résumée dans les tableaux suivants :

Incidence d'ACA dans le cas d'un LED^{15,21-26}

Anticorps Isotype	SLE %	% Incidence sur APS
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Un isotype	53	71

Maladies associées aux ACA^{24,27-31}

Etat	% Incidence
Thrombose Veineuse Récurrente	28-71
Perte foetale récurrente	28-64
Myélite Transverse	50
Anémie Hémolytique	38
Thrombocytopénie	27-33
Occlusions Artérielles	25-31
Livedo Reticularis	25
Hypertension Pulmonaire	20-40

FR

<10 U/ml (<10 APL, GPL ou MPL). Si le test est lancé en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer les unités. Lors de la réalisation de déterminations Qualitatives, la densité optique du calibre D doit être supérieure à celle du contrôle négatif et inférieure à l'absorbance du contrôle positif. Pour les déterminations semi quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs comprises dans l'éventail mentionné sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

La concentration des échantillons de patients peut être déterminée par l'une des deux méthodes suivantes :

1. DETERMINATION QUALITATIVE

Abs. de l'échantillon Test
----- X Unités du Calibre D = Unités échantillon test
Abs. du Calibre D

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux au calibre D sont considérés comme positifs.

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Relever l'absorbance du calibre A jusqu'au calibre E par rapport à leurs concentrations respectives sur un papier graphique à logarithme linéaire. Relever les concentrations en U/ml (APL, GPL, MPL) sur l'axe X par rapport à l'absorbance sur l'axe Y et tracer une courbe point par point. Déterminer les concentrations sur les échantillons patients en se basant sur la courbe en accord avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Alternativement, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

Il est recommandé que les résultats semi quantitatifs soient signalés comme « positif », « négatif » ou « indéterminé » avec les valeurs unitaires U/ml. Les résultats indéterminés ou limites doivent être testés de nouveau et évalués selon d'autres méthodes de laboratoire, tel qu'indiqué dans les **Limites de la procédure**.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 64 donneurs de sang normaux et des spécimens de contrôle non atteints de syndrome des anti-phospholipides. La moyenne des sujets normaux plus un écart type (SD) optimisé (IgA=3,5SD, IgG=3SD, IgM=3,5SD) a été établie en tant que limite supérieure de l'analyse et une valeur de 15 U/ml lui a été attribuée selon les titrations des normes de Harris. Les informations suivantes servent seulement de guide pour l'interprétation des résultats laboratoires. Chaque laboratoire doit déterminer les valeurs normales qui lui sont propres.

Valeur ACA U/ml	Interprétation
<15 APL, GPL ou MPL	Négatif
15-22,5 APL, GPL ou MPL	Indéterminé (Limite)
>22,5 APL, GPL ou MPL	Positif

Plusieurs rapports suggèrent que des niveaux bas d'anticorps anti-cardiolipides peuvent être constatés pour plusieurs troubles cliniques qui n'ont pas de relation avec le syndrome des anticorps anti-phospholipides. Par conséquent, selon les recommandations des chercheurs, le diagnostic du syndrome des anticorps antiphospholipides doit être effectué lorsque les résultats sont modérément ou clairement positifs.¹⁴ Il est suggéré que > 40 unités GPL ou MPL utilisées pour

ES

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son "positivos" o "negativos". Los resultados de los análisis iguales o superiores al Calibrador D son considerados positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA

Determine la absorbancia de los Calibradores A a E en base a sus concentraciones respectivas sobre papel para gráficos lineales logarítmicos. Determine las concentraciones en U/ml (APL, GPL, MPL) en el eje X y la absorbancia en el eje Y y dibuje una curva de punto a punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente desde la curva de acuerdo con los valores de absorbancia correspondientes. Como alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

Es recomendable indicar si los resultados semi-cuantitativos son "positivos", "negativos" o "indeterminados" con valores en unidades U/ml. Los resultados indeterminados/en el límite deberían ser reanalizados y evaluados junto con otros métodos de laboratorio, tal como se indica en **Limitaciones del procedimiento**.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando muestras de 64 donantes de sangre normales y sin síndrome antifosfolípido. La media de estos sujetos más un SD optimizado (IgA=3,5SD, IgG=3SD, IgM=3,5SD) fue establecida como límite del ensayo y se le asignó un valor de 15 U/ml en base a valoraciones de los criterios de Harris. La información siguiente sirve únicamente como guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

Valor ACA U/ml	Interpretación
<15 APL, GPL o MPL	Negativo
15-22,5 APL, GPL o MPL	Indeterminado (Límite)
>22,5 APL, GPL o MPL	Positivo

La documentación sugiere que pueden darse unos niveles bajos de anticuerpos anticardiolipina en variedad de afecciones clínicas no relacionadas con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. Así, de acuerdo con las recomendaciones de los investigadores, el diagnóstico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos sólo debería realizarse cuando los resultados de los análisis sean moderadamente o muy positivos.¹⁴ Se sugiere que > 40 unidades GPL o MPL emplearse para diferenciar entre niveles bajos de ACA positivos relacionado con la APS y moderados a altos niveles ACA asociados con manifestaciones clínicas de la APS.¹⁹

Calibrador

Los calibradores listos para utilizar vienen incluidos para proporcionar una determinación semi-cuantitativa y deben ser utilizados en cada análisis. Las muestras de pacientes que contienen niveles altos de anticuerpos pueden arrojar unos valores de absorbancia superiores que los del Calibrador A. Para determinar unos valores semi-cuantitativos precisos, esos especímenes deberían diluirse más para que entren en el registro de la curva del calibrador al volver a analizarlos. Para determinar los valores en U/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El análisis Immulisa™ ACA no debería ser realizado en muestras muy hemolizadas, con contaminación microbiana o lipémicas. Este método debería ser utilizado únicamente para analizar muestras de suero humano.

ES

Es muy recomendable realizar análisis en busca de los tres isotipos ACA. Buscar sólo uno y no todos los isotipos puede producir falsos negativos. Además, no se puede realizar un diagnóstico en base únicamente a los resultados de ACA. Deben tenerse en cuenta también los resultados de otros análisis de laboratorio y pruebas clínicas. Cuando el análisis de ACA da negativo en presencia de indicaciones clínicas, es recomendable realizar un análisis de anticoagulante lúpico y otros análisis adicionales. También encontramos fugazmente ACA en variedad de enfermedades infecciosas. En esos casos, los pacientes que den positivo en ACA deberían volver a realizarse las pruebas después de que pase un periodo de tiempo adecuado. Los pacientes activos o seropositivos para sífilis pueden presentar unos niveles de ACA elevados. Para descartar la sífilis deben realizarse análisis de confirmación.

Los anticuerpos anticardiolipina también se han asociado a síndromes neurológicos como efectos isquémicos pasajeros y la migraña.¹³ En cambio, en los pacientes con síndrome antifosfolípido, los anticuerpos suelen persistir durante periodos más largos e incluso pueden preceder a la aparición de los síntomas clínicos.²⁻⁴

VALORES ESPERADOS

En las tablas siguientes se resume la incidencia de ACA en diversas afecciones:

Incidencia de ACA en LES^{15,21-26}

Anticuerpo isotipo	SLE % incidencia	APS % incidencia
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Any isotype	53	71

Asociación de enfermedades de ACA^{24,27-31}

Enfermedad	% Incidencia
Trombosis venosa recurrente	28-71
Pérdida fetal recurrente	28-64
Mielitis transversa	50
Anemia hemolítica	38
Trombocitopenia	27-33
Oclusiones arteriales	25-31
Livedo Reticularis	25
Hipertensión pulmonar	20-40

Se analizaron series de muestras clínicas con los ensayos ELISA Immulisa™ para detección de ACA. A continuación incluimos unos resultados que demuestran la incidencia en la población para este estudio:

Categoría	IgA			IgG			IgM		
	n	pos	%	n	pos	%	n	pos	%
APS con estado desconocido de ACA	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
APS con participación de SLE y estado desconocido de ACA	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Sera presentado para la prueba de APS	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
Lupus eritematoso sistémico	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Sera presentado para la prueba SLE	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Trombocitopenia	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Preeclampsia	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Otras ayudas *	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

FR

Qualitative				Semi Quantitative			
A	Vierge	S5	Etc.	A	Vierge	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Étape 4 Préparer une dilution **1:101** des échantillons du patient en mélangeant **5 µl** des sera du patient avec **500µl** de diluant sérum.

Étape 5 Retirer les micropuits nécessaires du sachet et ranger les barrettes inutilisées dans le sachet fermé, dans le réfrigérateur. Placer fermement les micropuits dans le support supplémentaire fourni.

Étape 6 Verser à l'aide d'une pipette **100 µl** de Calibreurs prêts à l'emploi, contrôles positifs et négatifs et d'échantillons du patient dilués (**1:101**) dans les micropuits appropriés, selon la feuille de protocole.

Note : Inclure un puits qui ne contient que **100 µl** de diluant sérum comme blanc de réactif. Mettez sur zéro le lecteur ELISA avec le blanc de réactif.

Étape 7 Incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 8 Laver **4x** avec le tampon de lavage. Pour un lavage manuel, remplir chaque micropuits avec le tampon de lavage reconstitué. Disposez du fluide en renversant et en tapant afin de vider le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide contenu dans chaque puits. Pour absorber le liquide résiduel après le dernier lavage, inverser les barrettes et taper les puits vigoureusement sur des serviettes de papier absorbantes. Pour les systèmes de lavage automatisés, programmer le système de lavage selon les instructions du fabriquant.

Étape 9 Verser à l'aide d'une pipeteur **100 µl** de Conjugué dans les micropuits.

Étape 10 Laisser incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 11 Laver tous les micropuits selon la même méthode que lors de l'étape 8.

Étape 12 Verser à l'aide d'un pipeteur **100 µl** de Substrat d'Enzyme dans chaque micropuits dans le même ordre et selon le même minutage que pour le Conjugué.

Étape 13 Incuber **pendant 30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 14 Verser à l'aide d'un pipeteur **100 µl** de Solution d'Arrêt dans chaque micropuits dans le même ordre et selon le même minutage que lors de l'ajout du Substrat d'Enzyme. Lire les valeurs d'absorbance dans un délai de 30 minutes à partir du moment où la solution d'arrêt a été ajoutée.

Étape 15 Lire l'absorbance de chaque micropuits à **450 nm** en utilisant un lecteur simple ou à 450/630 nm en utilisant un lecteur de microplaques à double longueur d'onde en comparaison avec le blanc de réactif placé sur zéro absorbance.

Contrôle Qualité

Les Calibreurs, les Contrôles Positifs et Négatifs et le blanc de réactif doivent être utilisés pour chaque analyse afin de vérifier l'intégrité et la précision du test. La valeur d'absorbance du blanc de réactif doit être <0,3. La valeur d'absorbance du Calibreur A ne doit pas être inférieure à 1,0 sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être

COLLECTE ET MANIPLULATION DES SPECIMENS

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés pour cette procédure. L'emploi d'échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes peut interférer avec la réalisation du test et ceux-ci ne doivent pas être utilisés. Veuillez conserver les spécimens à 2°-8°C pendant une période inférieure à une semaine. Pour un stockage pendant une période plus longue, les spécimens de sérum doivent être congelés. Eviter les congélations et décongélations successives des échantillons. Il est recommandé de tester les spécimens congelés dans un délai d'un an.

PROCÉDURE

Notes concernant la Procédure

- Veuillez lire attentivement la notice du produit avant de commencer l'analyse.
- Laissez les spécimens des patients et les réactifs du test s'équilibrer à la température ambiante avant de commencer la procédure de test. Remplacez tous les spécimens et réactifs non utilisés dans le réfrigérateur immédiatement après utilisation.
- Otez les barrettes de puits nécessaires du sachet et refermez soigneusement le sachet pour éviter la condensation des barrettes de puits inutilisées. Rangez immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant le début de l'analyse.
- **Une bonne technique de lavage est essentielle.** Si le lavage est effectué manuellement, un lavage approprié peut être réalisé en appliquant un jet puissant de tampon de lavage avec une pissette équipée d'un embout large, sur l'intégralité de la microplaque. **Un système de lavage de microplaques automatisé est recommandé.**
- Utiliser un pipeteur multicanaux capable de remplir 8 à 12 puits simultanément. Cela permet d'accélérer le processus et permet également des temps d'incubation plus uniformes.
- Durant toutes les étapes, un contrôle attentif du temps est important. Le début de toute période d'incubation commence avec la réalisation de l'addition de réactif.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit être réalisée au même rythme et dans le même ordre.

Méthode de Test

- Étape 1** Laisser tous les réactifs et les spécimens s'équilibrer à la température ambiante.
- Étape 2** Etiqueter la feuille de protocole pour indiquer la disposition des échantillons dans les puits. Selon les bonnes pratiques de laboratoire, il est souhaitable d'analyser des échantillons en double.
- Étape 3** Pour une **détermination qualitative** utiliser le Calibreur D (*firole avec la capsule jaune*) seulement.
- ou**
- Pour une **détermination semi-quantitative** utiliser les Calibreurs A jusqu'à E, comme décrit dans l'exemple de disposition ci-dessous.

* Otra enfermedad autoinmune incluye enfermedad celíaca, miositis, artritis reumatoide, esclerodermia, tiroiditis y vasculitis

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de las pruebas ELISA Immulisa™ para detección de ACA fue evaluada analizando muestras de pacientes de LES positivos en cardioplipina junto con controles de enfermedades. Estos especimenes también fueron analizados con equipos ELISA disponibles comercialmente. Sólo se incluyeron en la comparación los especimenes del registro lineal del ensayo. Los resultados se resumen a continuación.

A. Mejorado ELISA Immulisa™ para ACA frente a otras ELISA para ACA:

		Otras ELISA ACA IgA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	105	15	120
ACA	Negativo	39	462	501
IgA ELISA	Total	144	477	621
Concordancia de porcentaje positivo:		72,9% (95% CI 64,8% - 79,8%)		
Concordancia de porcentaje negativo:		96,9% (95% CI 95,7% - 98,2%)		
Concordancia de porcentaje total:		91,3% (95% CI 88,7% - 93,3%)		
Enfermedad asociada sujetos (APS, SLE, APS con SLE, sospechosos de APS y SLE): n = 432				
Controles de la enfermedad: n = 189				
		Otras ELISA ACA IgG		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	155	32	187
ACA	Negativo	25	467	492
IgG ELISA	Total	180	499	679
Concordancia de porcentaje positivo:		86,1% (95% CI 80,0% - 90,6%)		
Concordancia de porcentaje negativo:		93,6% (95% CI 91,0% - 95,5%)		
Concordancia de porcentaje total:		91,6% (95% CI 89,2% - 93,5%)		
Enfermedad asociada sujetos (APS, SLE, APS con SLE, sospechosos de APS y SLE): n = 464				
Controles de la enfermedad: n = 217				

B. Reactividad cruzada: Se analizaron en busca de ACA utilizando los ensayos ELISA Mejorado™ Immulisa™ para ACA conjuntos de especimenes con posible reactividad cruzada de individuos con otras afecciones autoinmunes.

Condición	IgA n	Pos	% Pos	IgG n	Pos	% Pos	IgM n	Pos	% Pos
Enfermedad celíaca	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
EMTC	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Miositis	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Artritis reumatoide	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
Síndrome de Sjögren	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Sífilis	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Esclerosis sistémica	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%
Tiroiditis	8	0	0,0%	8	0	0,0%	7	0	0,0%

ES

Precisión

La precisión fue analizada con 6 especímenes seleccionados en todo el registro del ensayo. Se realizaron análisis de 6 muestras duplicadas de cada espécimen durante 13 ensayos. La repetibilidad fue determinada con 12 muestras duplicadas de cada espécimen.

Muestra	Media (U/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro de serie (Repetibilidad)	
		SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%	SD (U/ml)	CV%
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

Reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad cualitativa, se realizaron 90 repeticiones de muestras en el rango negativo bajo, cerca del corte, en el rango positivo moderado y aproximadamente +20% de los cortes de ensayo para cada isotipo ACA. Resultados del análisis de las muestras positivas negativas y moderadas bajas producen 100% de concordancia cualitativa. + 20% especímenes producen (IgA) el 98%, 99% (IgG) y Acuerdo cualitativo de 98% (IgM). Muestras de corte aproximadas produjeron 52% (IgA), 60% (IgG) y Acuerdo cualitativo de 60% (IgM). -20% muestras producen 99% (IgA), 100% (IgG) y Acuerdo cualitativo de 97% (IgM).

Límite de detección

En base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS), los límites de detección para los anticuerpos ACA se determinaron en: IgA 1,8 APL, IgG 0,6 GPL, e IgM 2,8 MPL.

Linealidad y recuperación

Se realizaron estudios utilizando series de dilución equidistantes de muestras positivas con valores de todo el ámbito del calibrador para determinar el ámbito lineal del ensayo. La linealidad del ensayo se determinó en: IgA 1,8 a 120 APL, IgG 1,0 a 120 GPL e IgM 2,8 a 120 MPL. Los resultados se resumen a continuación. Sugerimos que las muestras que produzcan resultados superiores al calibrador mayor sean diluidas y analizadas de nuevo para obtener unos resultados semicuantitativos precisos.

FR

CALIBRATOR|C|ACA-M

CALIBRATOR|D|ACA-M

CALIBRATOR|E|ACA-M

1 x 15 ml IgA-CONJ|HRP

1 x 15 ml IgG-CONJ|HRP

1 x 15 ml IgM-CONJ|HRP

1 x 60 ml DIL

1 x 15 ml SUBSTRATE|TMB

1 x 15 ml STOP|H2SO4

2 x fioles BUF|WASH

1 x

Éléments Additionnels

1 x 60ml BUF|WASH

(capsule bleue) 30 MPL, Calibreur D (capsule jaune) 15 MPL, et Calibreur E (capsule orange) 1 MPL. Dérivés de sérum humain contenant des ACA IgM. Les concentrations en MPL sont inscrites sur les étiquettes.

Globuline de chèvre anti-IgA humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP) pour REF 5118A. Prête à l'emploi. Code couleur rose.

Globuline de chèvre anti-IgG humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP) pour REF 5118G. Prête à l'emploi. Code couleur rose.

Globuline de chèvre anti-IgM humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP) pour REF 5118M. Prête à l'emploi. Code couleur rose.

Diluant sérum. Prêt à l'emploi.

Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. **Protéger de la lumière.**

Solution d'arrêt. Prête à l'emploi.

Tampon de Lavage en Poudre. **Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre chacun.**

Feuille de Protocole

Tampon de Lavage Liquide concentré. **Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre.**

Symboles utilisés sur les étiquettes



Numéro de lot



Numéro Catalogue



Utilisation pour un diagnostic in vitro



Utiliser avant



Température de stockage



Lire les instructions avant utilisation



Nombre de tests



Fabriqueur

Matériel Requis Mais Non Fourni

- Eau déminéralisée ou distillée
- Pissette en plastique pour distribuer la solution de tampon de lavage
- Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever 5 µl à 1000 µl
- Embouts de pipettes jetables
- Tubes à essai propres 12 x 75 mm et support de tubes à essai
- Chronomètre de laboratoire
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque capable de lire les valeurs d'absorbance à 450 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être réglé sur 600-650 nm
- Système de lavage automatique de microplaques capable de délivrer 200 µl

FR

Le Substrat d'Enzyme TMB contient une substance irritante qui peut être dangereuse si elle est inhalée, ingérée ou absorbée par voie cutanée. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

Les instructions doivent être suivies précisément, telles qu'elles apparaissent dans cette notice d'utilisation afin de garantir la validité des résultats. Ne pas interchanger les éléments du kit avec des éléments provenant d'autres sources. Suivez les bonnes pratiques de laboratoire afin de minimiser la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs lors de la manipulation. Ne pas utiliser les éléments au delà de la date d'expiration qui figure sur les étiquettes.

Matériel fourni

ACA IgA ELISA	REF 5118A
ACA IgG ELISA	REF 5118G
ACA IgM ELISA	REF 5118M

Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 déterminations.

12 x 8	MICROPLATE ACA	Microplaque constituée de micropuits individuels sécables. Couverte d'un antigène cardiolipide bovin/homme B2GP1. Prête à l'emploi.
1 x 1.75 ml	CONTROL + ACA-A	Contrôle Positif (capsule rouge) prêt à l'emploi pour REF 5118A. Contient du sérum humain positif aux anticorps cardiolipides IgA. L'éventail de concentration espéré en APL est imprimé sur l'étiquette.
1 x 1.75 ml	CONTROL + ACA-G	Contrôle Positif (capsule rouge) prêt à l'emploi pour REF 5118G. Contient du sérum humain positif aux anticorps cardiolipides IgG. L'éventail de concentration espéré en GPL est imprimé sur l'étiquette.
1 x 1.75 ml	CONTROL + ACA-M	Contrôle Positif (capsule rouge) prêt à l'emploi pour REF 5118M. Contient du sérum humain positif aux anticorps cardiolipides IgM. L'éventail de concentration espéré en MPL est imprimé sur l'étiquette.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Contrôle Négatif prêt à l'emploi (capsule blanche). Contient du sérum humain.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-A CALIBRATOR B ACA-A CALIBRATOR C ACA-A CALIBRATOR D ACA-A CALIBRATOR E ACA-A	Série de 5 calibreurs prêts à l'emploi pour REF 5118A. Calibreur A (capsule verte) 120 APL, Calibreur B (capsule violette) 60 APL, Calibreur C (capsule bleue) 30 APL, Calibreur D (capsule jaune) 15 APL, et Calibreur E (capsule orange) 1 APL. Dérivés de sérum humain contenant des ACA IgA. Les concentrations en APL sont inscrites sur les étiquettes.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-G CALIBRATOR B ACA-G CALIBRATOR C ACA-G CALIBRATOR D ACA-G CALIBRATOR E ACA-G	Série de 5 calibreurs prêts à l'emploi pour REF 5118G. Calibreur A (capsule verte) 120 GPL, Calibreur B (capsule violette) 60 GPL, Calibreur C (capsule bleue) 30 GPL, Calibreur D (capsule jaune) 15 GPL, et Calibreur E (capsule orange) 1 GPL. Dérivés de sérum humain contenant des ACA IgG. Les concentrations en GPL sont inscrites sur les étiquettes.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-M CALIBRATOR B ACA-M	Série de 5 calibreurs prêts à l'emploi pour REF 5118M. Calibreur A (capsule verte) 120 MPL, Calibreur B (capsule violette) 60 MPL, Calibreur C

ES

IgA	Registro de análisis (APL)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% recuperación (obtenido/esperado)
	2,6 a 47,6	0,999 (0,95 a 1,05)	-0,52 (-1,95 a 0,991)	1	97,7% a 1114,0%
	18,4 a 70,4	0,997 (0,85 a 1,15)	1,57 (-5,28 a 8,43)	0,98	85,1% a 101,9%
	20,0 a 107,6	1,126 (1,00 a 1,26)	0,07 (-9,49 a 9,62)	0,99	84,4% a 100%
IgG	Registro de análisis (GPL)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% recuperación (obtenido/esperado)
	4,5 a 27,8	0,995 (0,94 a 1,05)	0,35 (-0,66 a 1,35)	1	90,8% a 101,1%
	2,4 a 98,1	0,989 (0,90 a 1,08)	-0,73 (-6,11 a 4,66)	0,99	95,9% a 114,6%
	3,1 a 107,5	1,168 (0,94 a 1,40)	-4,73 (-20,64 a 11,17)	0,97	82,6% a 102,8%
IgM	Registro de análisis (MPL)	Inclinación (95% CI)	Corte Y (95% CI)	R ²	% recuperación (obtenido/esperado)
	5,6 a 28,3	0,925 (0,83 a 1,02)	1,70 (-0,05 a 3,44)	0,99	83,0% a 102,3%
	5,8 a 86,8	0,97 (0,87 a 1,07)	1,16 (-4,37 a 6,69)	0,99	93,4% a 106,9%
	5,5 a 103,6	0,939 (0,76 a 1,11)	4,78 (-5,89 a 15,46)	0,99	81,6% a 105,2%

Interferencia

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de ACA conocidos para cada isotipo con muestras de suero con interferencia potencial y estudiando la desviación respecto a los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: Hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), Factor Reumatoide (100 EU/ml, Triglicéridos (37 mmol/L), y Colesterol (13 mmol/L).



ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin-Antikörper (ACA) ELISAs

Cardiolipin/Phospholipid IgA, IgG oder IgM-Antikörper ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

PRODUKTBEILAGE

REF	5118A	ACA IgA ELISA	96 Bestimmungen
REF	5118G	ACA IgG ELISA	96 Bestimmungen
REF	5118M	ACA IgM ELISA	96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgA Antikörper (ACA) ELISA: Enzyme linked Immunoassay (ELISA) für die qualitative oder semi-quantitativen Nachweis von Cardiolipin-IgA-Antikörper im menschlichen Serum bei der Diagnose des antiphospholipid-Syndrom (APS) und APS mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests verbunden.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgG Antikörper (ACA) ELISA: Enzyme linked Immunoassay (ELISA) für die qualitative oder semi-quantitativen Nachweis von Cardiolipin-IgG-Antikörper im menschlichen Serum bei der Diagnose des antiphospholipid-Syndrom (APS) und APS mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests verbunden.

ImmuLisa Enhanced™ Cardiolipin IgM Antikörper (ACA) ELISA: Enzyme linked Immunoassay (ELISA) für die qualitative oder semi-quantitativen Nachweis von Cardiolipin IgM-Antikörpern im menschlichen Serum bei der Diagnose des antiphospholipid-Syndrom (APS) und APS mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) in Verbindung mit klinischen Befunden und anderen Labortests verbunden.

Warnung: Bestätigten aktiv oder seropositiven Syphilis-Patienten können Anti-Cardiolipin-Antikörper (ACA) Ebenen erhöht haben. Um Syphilis auszuschließen, sollten Bestätigungstests durchgeführt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antiphospholipid-Antikörper sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern gegen negativ geladene Phospholipide.¹ Sie werden in erster Linie durch den Antikardiolipin-Antikörper- (ACA) -Test, den biologischen Falsch-Positiv-Test für Syphilis und den Lupusantikoagulans-Test erkannt. Diese drei Tests erkennen verwandte, aber nicht notwendigerweise gleiche Antikörper. Deshalb ist manchmal mehr als einer dieser Tests erforderlich, um Antiphospholipid-Antikörper zu identifizieren. Das ELISA-Analysenformat ist eine hochempfindliche Nachweismethode von Antiphospholipid-Antikörpern.²

Das Vorhandensein von Antikardiolipin-Antikörpern hilft dabei, Patienten mit einem Risiko von venöser und/oder arterieller Thrombose häufig begleitet durch Thrombozytopenie, ein als Antiphospholipid-Syndrom bezeichnetes Syndrom, zu identifizieren.¹⁻¹² Das Antiphospholipid-Syndrom tritt am meisten bei Patienten mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder einer Lupus ähnlichen Krankheit auf, wo die Kriterien für SLE nicht erfüllt sind.⁵⁻⁷ Hohe Spiegel von Antikardiolipin-Antikörpern treten bei Thrombose,

critères pour le diagnostic d'un LED ne sont pas satisfaits.⁵⁻⁷ De hauts niveaux d'anticorps anti-cardiolipides sont constatés dans les cas de thromboses, pertes fœtales, thrombocytopénie ou autres troubles.¹⁻¹⁵ Des bas niveaux d'anticorps anti-cardiolipides sont constatés dans plusieurs troubles cliniques qui n'ont pas de relation avec un syndrome des anti-phospholipides. C'est pourquoi des niveaux bas d'anticorps sont d'une pertinence moindre.

Les anticorps anti-cardiolipides de types IgG et IgA semblent être associés de façon plus étroite avec le syndrome des anti-phospholipides que les anticorps de type IgM. Cependant, les anticorps de type IgM semblent être plus sensibles au traitement.^{5,10} Des niveaux bas d'anticorps IgM peuvent être identifiés dans le cas d'autres maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren primaire, le lupus érythémateux médicamenteux, la maladie de Lyme et la syphilis.^{8,10} Les Calibreurs et le Contrôle Positif utilisés dans le kit ont été normalisés selon les normes de Harris obtenues auprès du Antiphospholipid Standardization Laboratory.¹⁷

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Les puits d'un plateau de micropuits en polystyrène sont couverts avec des antigènes cardiolipides, s'en suit une mesure de blocage pour réduire les unions non spécifiques durant l'exécution de l'analyse. Les contrôles, les calibreurs et le sérum patient dilué sont ajoutés dans des puits distincts, pour permettre aux anticorps cardiolipides présents de se relier à l'antigène immobilisé. Les anticorps non-reliés sont enlevés en lavant les micropuits et un conjugué d'enzyme étiquetée anti IgG, IgA ou IgM humaines est ajouté aux micropuits. Les anticorps conjugués aux enzymes s'associent spécifiquement à l'immunoglobuline humaine du type approprié. Le conjugué non relié est enlevé par lavage et un substrat d'enzyme spécifique (TMB) est alors ajouté aux puits. La réaction enzymatique est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités par millilitre (U/ml) selon la classification de Harris. Les unités sont exprimées en GPL pour les IgG, MPL pour les IgM et APL pour les IgA.

RÉACTIFS

Stocker tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont stockés et manipulés comme indiqué.

Ne pas utiliser un réactif s'il n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Réhydratez le tampon de lavage jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée. Lorsque le tampon de lavage est conservé entre 2 et 8°C, il est stable jusqu'à la date d'expiration.

Les barrettes enduites des micropuits sont réservées à un usage unique. Les barrettes de micropuits non utilisées doivent être replacées avec précaution dans le sachet contenant les déshydratants pour empêcher une condensation et stockés entre 2 et 8°C.

Précautions

Tous les éléments dérivés du corps humain utilisés ont été testés pour les virus HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-1 et le résultat des tests était négatif, conformément aux exigences de la FDA. Cependant, les dérivés de sang humain et les spécimens des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Suivez les bonnes pratiques de laboratoire pour le stockage, la délivrance et l'élimination de ces matériaux.¹⁷

La solution d'arrêt est une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosive. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux. Éviter le contact avec les bases, métaux et autres composants qui pourraient réagir avec les acides.

ImmuLisa Enhanced™

Anticorps de cardiolipine (ACA)

ELISA

Cardiolipine/phospholipide IgA, IgG ou IgM anticorps ELISA

IVD For *in vitro* diagnostic use

DESCRIPTION DU PRODUIT

REF	5118A	ACA IgA ELISA	96 Déterminations
REF	5118G	ACA IgG ELISA	96 Déterminations
REF	5118M	ACA IgM ELISA	96 Déterminations

UTILISATION VISÉE

ImmuLisa Enhanced™ cardiolipine IgA anticorps (ACA) ELISA : Enzyme linked immuno-essai (ELISA) pour la détection qualitative ou semi-quantitative d'anticorps anti-cardiolipine IgA dans le sérum humain dans le diagnostic du syndrome des antiphospholipides (APS) et APS associées lupus Erythémateux Disséminé (LED) en conjonction avec d'autres tests de laboratoire et les résultats cliniques.

ImmuLisa Enhanced™ cardiolipine IgG anticorps (ACA) ELISA : Enzyme linked immuno-essai (ELISA) pour la détection qualitative ou semi-quantitative d'anticorps anti-cardiolipine IgG dans le sérum humain dans le diagnostic du syndrome des antiphospholipides (APS) et APS associées lupus Erythémateux Disséminé (LED) en conjonction avec d'autres tests de laboratoire et les résultats cliniques.

ImmuLisa Enhanced™ cardiolipine IgM anticorps (ACA) ELISA : Enzyme linked immuno-essai (ELISA) pour la détection qualitative ou semi-quantitative d'anticorps anti-cardiolipine IgM dans le sérum humain dans le diagnostic du syndrome des antiphospholipides (APS) et APS associées lupus Erythémateux Disséminé (LED) en conjonction avec d'autres tests de laboratoire et les résultats cliniques.

AVERTISSEMENT: Les patients confirmés de syphilis active ou séropositifs ont élevé taux d'anticorps (ACA) anti-cardiolipine. Afin d'exclure de la syphilis, les tests de confirmation doivent être effectués.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les anticorps anti-phospholipides sont un groupe hétérogène d'anticorps dirigés contre les phospholipides chargés négativement.¹ Ils sont détectés principalement par le test d'anticorps anti-cardiolipides (ACA), le test biologique faux positif pour la syphilis et le test de dépistage du lupus anticoagulant. Ces trois tests détectent des anticorps qui ont des similarités, mais qui ne sont pas nécessairement identiques. Ainsi, plus d'un de ces tests sont souvent nécessaires pour identifier les anticorps anti-phospholipides. Le format de l'analyse ELISA est une méthode très sensible de détection des anticorps anti-phospholipides.²

La présence d'anticorps anti-cardiolipides aide à identifier les patients présentant des risques de thromboses veineuses et / ou artérielles souvent accompagnés de thrombocytopénie, un syndrome qualifié de syndrome des anti-phospholipides.¹⁻¹² Le syndrome anti-phospholipide survient le plus souvent chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) ou d'autres maladies de type lupus dans lesquelles les

Abort, Thrombozytopenie und mehreren anderen Erkrankungen auf.¹⁻¹⁵ Niedrige Spiegel von Antikardiolipin-Antikörpern sind bei einer Vielzahl von klinischen Erkrankungen anzutreffen, die mit dem Antiphospholipid-Syndrom nicht in Beziehung stehen. Deshalb sind niedrige Spiegel dieser Antikörper von begrenzter Bedeutung.

IgG und IgA Klasse Antikardiolipin-Antikörper scheinen enger mit dem Antiphospholipid-Syndrom assoziiert zu sein als IgM Klasse Antikörper. Jedoch scheinen IgM Antikörper durch Behandlung mehr beeinflusst zu sein.^{5,10} Niedrige Spiegel von IgM Antikörpern können bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. Rheumatoidarthritis, primärem Sjögren-Syndrom, drogeninduzierter Lupus erythematodes, Lyme-Krankheit und Syphilis identifiziert werden.^{8,10} Die Kalibratoren und die im Kit verwendete Positivkontrolle sind gegen die Harris-Kalibrierungsstandards vom Antiphospholipid-Standardisierungslabor genormt worden.¹⁷

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Kardiolipin-Antigen wird mit den Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gebunden gefolgt von der Blockade der unreaktierten Stellen, um das nichtspezifische Binden zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in separate Vertiefungen hinzugefügt und ermöglichen irgendwelchen vorhandenen Kardiolipin-Antikörpern sich an das immobilisierte Antigen zu binden. Die ungebundene Probe wird abgewaschen und ein enzymmarkiertes anti-menschliches IgA, IgG oder IgM Konjugat wird zu jeder Vertiefung hinzugefügt. Diese Enzym konjugierten Antikörper, binden sich spezifisch mit dem menschlichen Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nach dem Abwaschen jedes ungebundenen Konjugats wird dann spezifisches Enzymsubstrat (TMB) zu den Vertiefungen hinzugefügt. Nach dem Stoppen der enzymatischen Reaktion wird die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Ergebnisse sind in Einheiten pro Milliliter (U/ml) gemäß der Harris Klassifizierung ausgedrückt. Die Einheiten für IgG sind als GPL für IgM als MPL und für IgA als APL ausgedrückt.

REAGENZIE

Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie es nicht, wenn das Reagenz nicht farblos oder wenn ein Präzipitat vorhanden ist. Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht werden.

Den Waschpuffer zu 1 Liter mit destilliertem oder vollentsalztem Wasser herstellen. Bei Lagerung mit 2-8°C bleibt der hergestellte Waschpuffer bis zum Kit-Ablaufdatum stabil.

Beschichtete Mikrovertiefungsstreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Ungebrauchte Mikrovertiefungsstreifen sollten im Trocknungsmittel enthaltenden Beutel sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8°C gelagert werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HBsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Menschliche Blutderivate und Patientenproben sollten jedoch als potenziell ansteckend betrachtet werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.¹⁷

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und ätzend. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Die Exponierung gegenüber Basen, Metallen oder anderen Verbindungen vermeiden, die mit Säuren reagieren können.

DE

TMB-Enzymsubstrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann, wenn er eingeatmet, aufgenommen oder durch die Haut absorbiert wird. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden.

Die Anweisungen wie sie in dieser Kit-Beilage angegeben sind sollten genau befolgt werden, um gültige Resultate sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Gute Laborpraktiken befolgen, um mikrobiische und Querkontamination von Reagenzien beim Handling zu minimieren. Verwenden Sie die Kit-Komponenten nicht über das auf den Etiketten angegebene Ablaufdatum hinaus.

Bereitgestellte Materialien

ACA IgA ELISA

ACA IgG ELISA

ACA IgM ELISA

REF 5118A

REF 5118G

REF 5118M

Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

12 x 8	MICROPLATE ACA	Mikroplatte mit individuell abbrechbaren Mikrovertiefungen Rinder/menschlichen B2GP1. Beschichtet mit Kardiopilin-Antigen. Gebrauchsfertig.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ ACA-A	Einsatzbereite Positivkontrolle (roter Verschlussdeckel) für REF 5118A. Enthält Humanserum positiv für Kardiopilin IgA Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in APL ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ ACA-G	Einsatzbereite Positivkontrolle (roter Verschlussdeckel) für REF 5118G. Enthält Humanserum positiv für Kardiopilin IgG Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in GPL ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1.75 ml	CONTROL+ ACA-M	Einsatzbereite Positivkontrolle (roter Verschlussdeckel) für REF 5118M. Enthält Humanserum positiv für Kardiopilin IgM Antikörper. Der erwartete Konzentrationsbereich in MPL ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1.75 ml	CONTROL-	Einsatzbereite Negativkontrolle (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-A CALIBRATOR B ACA-A CALIBRATOR C ACA-A CALIBRATOR D ACA-A CALIBRATOR E ACA-A	Einsatzbereiter Satz von 5 Kalibratoren für REF 5118A. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 120 APL, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 60 APL, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 30 APL, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 15 APL und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 APL. Abgeleitet aus Humanserum, das ACA IgA enthält. Konzentrationen in APL sind auf den Etiketten aufgedruckt.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-G CALIBRATOR B ACA-G CALIBRATOR C ACA-G CALIBRATOR D ACA-G CALIBRATOR E ACA-G	Einsatzbereiter Satz von 5 Kalibratoren für REF 5118G. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 120 GPL, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 60 GPL, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 30 GPL, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 15 GPL und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 GPL. Abgeleitet aus Humanserum, das ACA IgG enthält. Konzentrationen in GPL sind auf den Etiketten aufgedruckt.

DE

IgG	Prüfbereich (GPL)	Anstieg (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R ²	% Rückgewinnung (Erhalt./Erw.)
	4,5 bis 27,8	0,995 (0,94 bis 1,05)	0,35 (-0,66 bis 1,35)	1	90,8% to 101,1%
	2,4 bis 98,1	0,989 (0,90 bis 1,08)	-0,73 (-6,11 bis 4,66)	0,99	95,9% to 114,6%
	3,1 bis 107,5	1,168 (0,94 bis 1,40)	4,734 (-20,64 bis 11,17)	0,97	82,6% to 102,8%
IgM	Prüfbereich (MPL)	Anstieg (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R ²	% Rückgewinnung (Erhalt./Erw.)
	5,6 bis 28,3	0,925 (0,83 bis 1,02)	1,70 (-0,05 bis 3,44)	0,99	83,0% to 102,3%
	5,8 bis 86,8	0,97 (0,87 bis 1,07)	1,16 (-4,37 bis 6,69)	0,99	93,4% to 106,9%
	5,5 bis 103,6	0,939 (0,76 bis 1,11)	4,78 (-5,89 bis 15,46)	0,99	81,6% to 105,2%

Interferenz

Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten ACA-Spiegeln für jeden Isotyp mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serumproben und der Abweichung von erwarteten Resultaten studiert. Es wurde keine bedeutende Interferenz für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L). Bilirubin (342 µ Mol/L). Rheumafaktor (100 EU/ml). Triglyceride (37 mmol/L). und Cholesterin (13 mmol/L).

DE

Probe	Mittelwert U/ml	Gesamtungenauigkeit		Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
		SD U/ml	CV %	SD U/ml	CV %	SD U/ml	CV %
IgA 1	2,5	0,4	14,0%	0,366	14,6%	0,234	8,8%
IgA 2	12,4	1,0	8,0%	1,014	8,2%	0,915	7,4%
IgA 3	17,9	1,4	8,0%	1,470	8,2%	1,233	6,9%
IgA 4	29,1	2,4	8,2%	2,499	8,5%	1,466	5,2%
IgA 5	53,1	4,1	7,6%	4,182	7,9%	3,088	5,9%
IgA 6	103,7	6,8	6,5%	6,922	6,7%	5,847	5,5%
IgG 1	3,8	0,183	9,2%	0,177	8,6%	0,207	9,6%
IgG 2	12,0	1,117	9,3%	1,118	9,3%	1,050	9,1%
IgG 3	18,0	1,676	9,3%	1,723	9,5%	1,383	7,7%
IgG 4	31,3	2,738	8,7%	2,805	8,9%	1,651	5,5%
IgG 5	80,4	7,586	9,4%	8,049	10,0%	3,317	4,1%
IgG 6	99,0	6,806	6,9%	7,011	7,0%	4,560	4,7%
IgM 1	11,6	0,930	8,0%	0,930	8,0%	0,407	3,5%
IgM 2	13,0	1,084	8,4%	1,084	8,4%	0,904	7,0%
IgM 3	17,0	1,257	7,4%	1,257	7,4%	0,598	3,5%
IgM 4	45,7	2,292	5,0%	2,292	5,0%	1,305	2,9%
IgM 5	79,9	5,580	7,0%	5,580	7,0%	3,609	4,5%
IgM 6	114,8	6,603	5,8%	6,603	5,8%	4,811	4,2%

Reproduzierbarkeit

90 Wiederholungen von Proben im niedrigen negativen Bereich, nahe der Cutoff, im Bereich von moderaten positiven und ca. +/-20 % von der Assay-Cutoffs für jedes Isotype ACA wurden durchgeführt, um die qualitativen Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Untersuchungsergebnisse für geringe negative und mäßigen positiven Proben produziert 100 % qualitative Vereinbarung. + 20 % Exemplare produziert qualitative Vereinbarung von 98 % (IgM), 98 % (IgA) und 99 % (IgG). Ungefähre cutoff Exemplare produziert 60 % (IgM) qualitative Vereinbarung, 52 % (IgA) und 60 % (IgG). -20 % Exemplare produziert 97 % (IgM) qualitative Vereinbarung, 99 % (IgA) und 100 % (IgG).

Nachweisgrenze

Basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten mit jeweils 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS) wurden die Nachweisgrenzen (LoD) für ACA-Antikörper bestimmt mit: IgA 1,8 APL. IgG 0,6 GPL. und IgM 2,8 MPL.

Linearität und Rückgewinnung

Studien wurden unter Verwendung von abstandsgleichen Verdünnungsserien von positiven Proben mit Werten überall im Bereich des Kalibrators ausgeführt, um den linearen Bereich der Prüfung zu bestimmen. Der lineare Bereich der Prüfung wurde bestimmt mit: IgA 1,8 bis 120 APL. IgG 1,0 bis 120 GPL und IgM 2,8 bis 120 MPL. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst. Es wird empfohlen, dass Proben, die Resultate größer als der obere Kalibrator hervorbringen, für genaue semiquantitative Resultate verdünnt und erneut getestet werden.

IgA	Prüfbereich (APL)	Anstieg (95% CI)	Y-Achsenabschnitt (95 % CI)	R ²	% Rückgewinnung (Erhalt./Erw.)
	2,6 bis 47,6	0,999 (0,95 bis 1,05)	-0,52 (-1,95 bis 9,91)	1	97,7% to 114,0%
	18,4 bis 70,4	0,997 (0,85 bis 1,15)	1,57 (-5,28 bis 8,43)	0,98	85,1% to 101,9%
	20,0 bis 107,6	1,126 (1,00 bis 1,26)	0,07 (-9,49 bis 9,62)	0,99	84,4% to 100%

DE

5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A ACA-M
	CALIBRATOR B ACA-M
	CALIBRATOR C ACA-M
	CALIBRATOR D ACA-M
	CALIBRATOR E ACA-M

1 x 15 ml IgA-CONJ | HRP

1 x 15 ml IgG-CONJ | HRP

1 x 15 ml IgM-CONJ | HRP

1 x 60 ml DIL

1 x 15 ml SUBSTRATE | TMB

1 x 15 ml STOP | H2SO4

2 x Phiole BUF | WASH

1 x

Optionale Komponenten

1 x 60 ml BUF | WASH

Symbole auf den Etiketten

LOT	Patientennummer
REF	Katalognummer
IVD	In-vitro-Diagnostik
	Gebrauch durch
	Lagertemperatur
	Anweisungen vor dem Gebrauch lesen
	Anzahl Tests
	Hersteller

Erforderliche Aber Nicht Bereitgestellte Materialien

- Entsalztes oder destilliertes Wasser
- Quetschflasche, um verdünnten Waschpuffer aufzunehmen
- Pipetten für 5 µl bis 1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher

Einsatzbereiter Satz von 5 Kalibratoren für REF 5118M. Kalibrator A (grüner Verschlussdeckel) 120 MPL, Kalibrator B (violetter Verschlussdeckel) 60 MPL, Kalibrator C (blauer Verschlussdeckel) 30 MPL, Kalibrator D (gelber Verschlussdeckel) 15 MPL und Kalibrator E (orangefarbener Verschlussdeckel) 1 MPL. Abgeleitet aus Humanserum, das ACA IgM enthält. Konzentrationen in MPL sind auf den Etiketten aufgedruckt.

HRP-Ziege anti-menschliches IgA-Konjugat für REF 5118A. Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.

HRP-Ziege anti-menschliches IgG-Konjugat für REF 5118G. Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.

HRP-Ziege anti-menschliches IgM-Konjugat für REF 5118M. Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.

Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig.

TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. **Vor Licht schützen.**

Stopp-Lösung. Gebrauchsfertig.

Pulver Waschpuffer. **Zu je einem Liter wiederherstellen.**

Protokollblätter

Flüssigkeit konzentrierter Waschpuffer. **Zu einem Liter wiederherstellen.**

DE

- Mikroplattenleser, fähig Absorptionswerte bei 450 nm abzulesen. Wenn ein Zweiwellenlängen-Mikroplattenleser verfügbar ist, sollte der Referenzfilter bei 600-650 nm eingestellt werden
- Automatischer Mikroplattenwascher, fähig 200 µl zu dispensieren

PROBENENTNAHME UND HANDLING

Bei diesem Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Äußerst hämolysierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollten die Serumproben eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen.

VERFAHREN

Verfahrenshinweise

- Die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durchlesen.
- Die Patientenproben und Testreagenzien auf Raumtemperatur bringen, bevor mit dem Prüfverfahren begonnen wird. Alle ungebrauchten Proben und Reagenzien sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank stellen.
- Erforderliche Mikrovertiefungsstreifen aus dem Beutel entnehmen und den Beutel sorgfältig wieder versiegeln, um Kondensation in den ungebrauchten Vertiefungen zu verhindern. Den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank stellen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor dem Beginn der Untersuchung vorbereitet werden.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Bei manuellem Waschen wird adäquates Waschen dadurch erreicht, dass ein kräftiger Waschpufferstrom mit einer breitspitzigen Spritzflasche über die komplette Mikroplatte gerichtet wird. **Ein automatisierter Mikroplattenwascher wird empfohlen.**
- Eine Mehrkanalpipette verwenden, die 8 oder 12 Vertiefungen gleichzeitig versorgen kann. Das beschleunigt den Prozess und ermöglicht einheitlichere Inkubationszeiten.
- Bei allen Schritten ist die sorgfältige Kontrolle der Zeitmessung wichtig. Der Start aller Inkubationszeiten beginnt mit der Beendigung der Reagenzzugabe.
- Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte bei der gleichen Geschwindigkeit und in der gleichen Reihenfolge ausgeführt werden.

Prüfmethode

Schritt 1 Alle Reagenzien und Proben bei Raumtemperatur ins Gleichgewicht bringen.

Schritt 2 Protokollblatt kennzeichnen, um die Probenanordnung in den Vertiefungen anzuzeigen. Es ist gute Laborpraktik, mit einer zweifachen Ausführung der Proben zu arbeiten.

Schritt 3 Für eine **qualitative Bestimmung** nur den Kalibrator D (*Phiole mit gelbem Verschlussdeckel*) verwenden

oder

für eine **semiquantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie im nachfolgenden Proben-Layout verwenden.

DE

		Andere ACA IgG ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	155	32	187
ACA	Negativ	25	467	492
IgG ELISA	Gesamt	180	499	679
Positive Prozent-Übereinstimmung:		86,1% (95% CI 80,0% - 90,6%)		
Negative Prozent-Übereinstimmung:		93,6% (95% CI 91,0% - 95,5%)		
Gesamte Prozent-Übereinstimmung:		91,6% (95% CI 89,2% - 93,5%)		

Krankheit verbundenen Themen (APS, SLE, APS mit SLE, vermutete APS und SLE): n = 464
Krankheit-Steuerelemente: n = 217

		Andere ACA IgM ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	119	2	121
ACA	Negativ	50	419	469
IgM ELISA	Gesamt	169	421	590
Positive Prozent-Übereinstimmung:		70,4% (95% CI 62,8% - 77,1%)		
Negative Prozent-Übereinstimmung:		99,5% (95% CI 98,1% - 99,9%)		
Gesamte Prozent-Übereinstimmung:		91,2% (95% CI 88,5% - 93,3%)		

Krankheit verbundenen Themen (APS, SLE, APS mit SLE, vermutete APS und SLE): n = 408
Krankheit-Steuerelemente: n = 182

B. Kreuzreaktivität: Reihen von potenziell kreuzreaktiven Proben von Personen mit anderen Autoimmunerkrankungen wurden auf ACA unter Verwendung der ImmuLisa™ Verbessert ACA-ELISAs getestet.

Bedingung	IgA n	Pos	% Pos	IgG n	Pos	% Pos	IgM n	Pos	% Pos
Zöliakie	21	0	0,0%	22	0	0,0%	24	0	0,0%
MCTD	24	1	4,2%	23	1	4,3%	29	3	10,3%
Myositis	3	0	0,0%	3	1	33,3%	4	0	0,0%
Rheumatoide arthritis	89	2	2,2%	89	6	6,7%	95	7	7,4%
Sjögren-Syndrom	25	2	8,0%	25	2	8,0%	27	3	11,1%
Syphilis	40	6	15,0%	40	33	82,5%	40	14	35,0%
Systemische Sklerose	44	1	2,3%	44	0	0,0%	45	2	4,4%
Thyreoiditis	8	0	0,0%	8	0	0,0%	7	0	0,0%

Präzision

Die Präzision wurde mit 6 aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten Proben geprüft. Prüfungsabläufe von 6 Replikaten jeder Probe wurden in 13 Prüfungen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt.

Zustand	% Inzidenz
Rekurrierende Venenthrombose	28-71
Rekurrierender Abort	28-64
Transversale Myelitis	50
Hämolytische Anämie	38
Thrombozytopenie	27-33
Arterienverschlüsse	25-31
Livedo reticularis	25
Pulmonale Hypertonie	20-40

Sätze klinischer Proben wurden auf Immulisa™ ACA-ELISAs geprüft. Resultate, welche die Inzidenz in den Populationen für diese Studie demonstrieren, sind nachstehend aufgeführt.

Kategorie	IgA			IgG			IgM		
	n	pos	%	n	pos	%	n	pos	%
APS mit ACA-Status unbekannt	127	11	8,7%	99	56	56,6%	108	38	35,2%
APS mit SLE-Beteiligung und ACA-Status unbekannt	53	30	56,6%	95	47	49,5%	83	19	22,9%
Seren für Tests des APS eingereicht	188	14	7,4%	184	45	24,5%	188	13	6,9%
SLE	79	13	16,5%	83	20	24,1%	86	8	9,3%
Seren für SLE Tests eingereicht	90	5	5,6%	88	13	14,8%	90	5	5,6%
Thrombozytopenie	15	1	6,7%	15	2	13,3%	15	0	0%
Präeklampsie	15	1	6,7%	15	3	20,0%	15	0	0%
Andere Hilfe *	214	6	2,8%	214	10	4,7%	231	15	6,5%
NHS	167	2	1,2%	164	5	3,0%	154	4	2,6%

* Andere Autoimmunkrankheiten gehören Zöliakie, Myositis, rheumatoide Arthritis, Sklerodermie, Thyreoiditis und Vaskulitis

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Nützlichkeit der Immulisa™ Verbessert ACA-ELISAs wurde durch Prüfen gut charakterisierter Serumproben von Kardiolipin positiven SLE-Probanden neben Krankheitsbekämpfungen. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen ELISA-Kits geprüft. Nur Proben im linearen Bereich der Prüfung wurden im Methodenvergleich eingeschlossen. Die Resultate sind nachstehend zusammengefasst.

A. Immulisa™ Verbessert ACA ELISAs gegenüber anderen ACA ELISAs:

		Andere ACA IgA ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
IMMCO	Positiv	105	15	120
ACA	Negativ	39	462	501
IgA ELISA	Gesamt	144	477	621
Positive Prozent-Übereinstimmung:		72,9% (95% CI 64,8% - 79,8%)		
Negative Prozent-Übereinstimmung:		96,9% (95% CI 95,7% - 98,2%)		
Gesamte Prozent-Übereinstimmung:		91,3% (95% CI 88,7% - 93,3%)		

Krankheit verbundenen Themen (APS, SLE, APS mit SLE, vermutete APS und SLE): n = 432
Krankheit-Steuerelemente: n = 189

Qualitativ				Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S5	usw.	A	Leerprobe	S1	usw.
B	-Kontrolle	S6		B	-Kontrolle	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Step 4 1:101 Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von 5 µl der Patientenseren mit 500 µl des Serumverdünnungsmittels vorbereiten.

Schritt 5 Die erforderlichen Mikrovertiefungen aus dem Beutel entnehmen und ungebrauchte Streifen im versiegelten Beutel wieder zurück in den Kühlschrank stellen. Die Mikrovertiefungen sicher im extra bereitgestellten Halter platzieren.

Schritt 6 Mit der Pipette 100 µl von einsatzbereiten Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und verdünnte Patientenproben (1:101) gemäß dem Protokollblatt in die zugehörigen Mikrovertiefungen geben.

Hinweis: Eine Vertiefung, die 100 µl an Serumverdünnungsmittel enthält, als eine Reagenz-Leerprobe einschließen. Den ELISA-Leser gegen die Reagenz-Leerprobe nullen.

Schritt 7 30 Minuten (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 8 4x mit dem Waschpuffer waschen.. Um manuell zu waschen, füllen Sie jede Mikrovertiefung mit dem wiederhergestellten Waschpuffer. Die Flüssigkeit durch Umkehren und Ausklopfen des Inhalts jeder Vertiefung oder durch Ansaugen der Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entsorgen. Die Streifen umkehren und die Vertiefungen kräftig auf saugfähigen Papierhandtüchern ausklopfen, um am Ende des letzten Waschens zu blotten. Bei einer automatischen Wascheinrichtung programmieren Sie diese gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Schritt 9 Mit der Pipette 100 µl des Konjugats in die Mikrovertiefungen geben.

Schritt 10 30 Minuten (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 11 Alle Mikrovertiefungen wie in Schritt 8 waschen.

Schritt 12 Mit der Pipette 100 µl des Enzymsubstrats in jede Mikrovertiefung in der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für das Konjugat zugeben.

Schritt 13 30 Minuten (± 5 min) bei Raumtemperatur inkubieren.

Schritt 14 Mit der Pipette 100 µl der Stopp-Lösung in jede Mikrovertiefung unter Verwendung der gleichen Reihenfolge und Zeitabfolge wie für die Zugabe des Enzymsubstrats zugeben. Die Absorptionswerte innerhalb von 30 Minuten nach Hinzufügen der Stopp-Lösung ablesen.

Schritt 15 Die Absorption jeder Mikrovertiefung bei 450 nm unter Verwendung eines Ein- oder bei 450/630nm unter Verwendung eines Zweiwellenlängen-Mikroplattenlesers gegen die auf Null-Absorption gesetzte Reagenz-Leerprobe ablesen.

Qualitätskontrolle

Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu

DE

verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte $<0,3$ sein. Der Kalibrator A sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 1,0 haben, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 U/ml (<10 APL, GPL or MPL). Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um die Einheiten zu bestimmen. Beim Durchführen von Qualitativen Bestimmungen muss die optische Dichte von Kalibrator D größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Für semiquantitative Bestimmungen muss die Positivkontrolle Werte im auf dem Phiole angegebenen Bereich ergeben.

RESULTATE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können durch zwei Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Abs. des Prüfmusters

----- X Einheiten von Kalibrator D = Einheiten von Prüfprobe

Abs. von Kalibrator D

Es wird empfohlen, dass qualitative Resultate als „positiv“ oder „negativ“ berichtet werden. Probenresultate größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv angesehen.

2. SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG

Die Absorption von Kalibrator A bis E gegen ihre jeweiligen Konzentrationen auf dem linear-logarithmischen Millimeterpapier aufnehmen. Die Konzentrationen in U/ml (APL, GPL, MPL) auf der X-Achse gegenüber der Absorption auf der Y-Achse aufnehmen und eine Punkt-Zu-Punkt-Kurvenanpassung zeichnen. Die Konzentrationen der Patientenproben von der Kurve gemäß den entsprechenden Absorptionswerten bestimmen. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als „positiv“, „negativ“, oder „unbestimmt“ mit U/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte/Grenz-Resultate sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden, wie in **BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS** angezeigt, bewertet werden.

Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen 64 normaler Blutspender und Nicht-Antiphospholipid-Syndrom-Krankheitsbekämpfungstypen bestimmt. Der Mittelwert dieser Probanden plus ein optimierter SD ($IgA=3,5SD$, $IgG=3SD$, $IgM=3,5SD$) wurde als der Prüfungs-Cutoff bestimmt und einem Wert von 15 U/ml basierend auf Titrationen der Harris-Standards zugeordnet. Die folgende Information dient nur als eine Führung in der Ausdeutung der Laborresultate. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte bestimmen.

ACA U/ml Wert	Ausdeutung
<15 APL, GPL oder MPL	Negativ
15-22,5 APL, GPL or MPL	Unbestimmt (Grenzlinie)
$>22,5$ APL, GPL oder MPL	Positiv

Die Literatur weist darauf hin, dass niedrige positive Antikardiolipin-Antikörperspiegel bei einer Vielzahl von klinischen Erkrankungen ohne Beziehung zu Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom auftreten könnten. Gemäß den Empfehlungen der Untersuchenden sollte man die Diagnose des Antiphospholipid-Antikörper-Syndroms

DE

folglich nur vornehmen, wenn die Prüfergebnisse mäßig oder sehr positiv sind.¹⁴ Es wird vorgeschlagen, die > 40 GPL oder der MPL Einheiten eingesetzt werden, um die Unterscheidung zwischen niedrigen positive ACA-Niveau unabhängig von APS und mäßigen ACA-hohen klinischen Manifestationen der APS.¹⁹

Kalibrator

Die einsatzbereiten Kalibratoren sind enthalten, um Semiquantifizierung zu ermöglichen, und müssen mit jedem Durchgang verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Absorptionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibrator Kurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um IU/ml-Werte zu bestimmen, multiplizieren Sie die durch den Verdünnungsfaktor erhaltenen Einheiten.

BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ ACA Test sollte nicht bei äußerst hämolysierten, mikrobisch verunreinigten oder lipämischen Proben ausgeführt werden. Diese Methode sollte nur zur Prüfung von Humanserum-Proben verwendet werden.

Das Prüfen auf alle drei Isotypen von ACA wird nachdrücklich empfohlen. Das Prüfen auf nur einen und nicht alle Isotypen kann zu falschen negativen Diagnosen führen. Des Weiteren kann man eine Diagnose nicht basierend auf ACA-Ergebnissen allein vornehmen. Die Ergebnisse anderer Labortests und klinischer Befunde müssen berücksichtigt werden. Wenn ein negativer ACA-Test in Gegenwart von klinischen Indikationen auftritt, sind ein Lupusantikoagulans-Test oder andere zusätzliche Prüfungen angezeigt. ACA tritt ebenfalls vorübergehend bei einer Vielzahl von ansteckenden Krankheiten auf. In diesen Fällen sollten auf ACA positive Patienten unter Einhaltung eines entsprechenden Intervalls erneut getestet werden. Bestätigte aktive oder seropositive Syphilis-Patienten können erhöhte ACA-Spiegel aufweisen. Um Syphilis auszuschließen, sollte man Bestätigungstests durchführen.

Antikardiolipin-Antikörper sind ebenfalls mit neurologischen Syndromen wie z. B. vorübergehende ischämische Wirkungen und Migräne assoziiert worden.¹³ Im Gegensatz dazu bestehen bei Patienten mit dem Antiphospholipid-Syndrom die Antikörper gewöhnlich für längere Zeiträume fort und können sogar dem Einsetzen von klinischen Symptomen vorausgehen.²⁻⁴

ERWARTETE WERTE

Die Inzidenz von ACA bei verschiedenen Krankheitszuständen ist in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Inzidenz von ACA in SLE^{15,21-26}

Antikörper Isotype	SLE % Inzidenz	APS % Inzidenz
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Jedes Isotype	53	71