



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



# ImmuLisa Enhanced™

# Cardiolipin IgA/IgG/IgM

# Antibody (ACA) ELISA

## Cardiolipin/Phospholipid Antibody Screen ELISA

**IVD** For *in vitro* diagnostic use

### PRODUCT INSERT

**REF** 5118S      ACA Screen ELISA      96 Determinations

### INTENDED USE

An enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative detection of Cardiolipin IgA, IgG and IgM antibodies in human serum to aid in the diagnosis of anti-phospholipid 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> 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.<sup>5-7</sup> High levels of anti-cardiolipin antibodies occur in thrombosis, fetal loss, thrombocytopenia and several other disorders.<sup>1-15</sup> Low levels of anti-cardiolipin antibodies are found in a variety of clinical disorders which are unrelated to antiphospholipid syndrome. Therefore, low levels of these antibodies are of limited significance.

IgG and IgA class anti-cardiolipin antibodies appear to be more closely associated with antiphospholipid syndrome than the IgM class antibodies. However, IgM antibodies appear to be more influenced by treatment.<sup>5,10</sup> 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.<sup>8,10</sup>

## PRINCIPLES OF PROCEDURE

Cardiolipin antigen as well as bovine and human B2GP1 is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrator and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any cardiolipin antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human IgA/IgG/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 ELISA units per milliliter (EU/ml).

## 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.<sup>16</sup>

Stop Solution is a dilute sulfuric acid solution. Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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

ImmLisa™ ACA Screen ELISA

REF 5118S

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

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+|ACASCREEN

Ready to use **Positive Control** (*red cap*). Contains human serum positive for ACA. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.

1 x 1.75 ml

CONTROL-

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

EN

1 x 1.75 ml CALIBRATOR|ACASCREEN

Ready to use Calibrator (green cap) 30 EU/ml. Derived from human serum containing ACA.

1 x 15 ml IgA|IgM-CONJ|HRP

HRP goat anti-human IgA/IgG/IgM Conjugate. 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.

## EN 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 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** It is recommended that samples be dispensed according to the layout below.

A	Blank	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	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 Calibrator, 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** ( $\pm 5$  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

EN

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.
- 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

Calibrator, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator should have an absorbance reading of not less than 0.2; otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. The optical density of the Calibrator must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. The positive control should give values in the range stated on the vial.

## RESULTS

### Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined using the following formula:

#### QUALITATIVE DETERMINATION

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

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to 20 EU/ml are considered positive.

### Calibrator

The Ready to Use Calibrator included must be used with each run.

### Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 normal blood donors and non-antiphospholipid syndrome disease control specimens. The mean of the normal subjects plus 2.75 SD was established as the assay cutoff and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

EN

ACA value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
≥20 EU/ml	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<sup>14,19</sup> Isotype-specific ACA assays are required to assess separate ACA IgA, IgG or IgM antibody levels. 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.<sup>20</sup>

### LIMITATIONS OF PROCEDURE

The Immulisa™ ACA Screen ELISA 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.<sup>17</sup>

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

### EXPECTED VALUES

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

Incidence of ACA in SLE<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

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

Disease Association of ACA<sup>22, 25-29</sup>

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

## EN

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

Category	n	pos	%
APS with unknown ACA status	90	56	62.2%
APS with SLE involvement and unknown ACA status	66	60	90.9%
Sera submitted for APS testing	185	38	20.5%
SLE	74	24	32.4%
Sera submitted for SLE testing	88	16	18.2%
Thrombocytopenia	15	2	13.3%
Pre-eclampsia	15	3	20.0%
Other AID*	192	14	7.3%
NHS	158	3	1.9%

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

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

A. Immulisa Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM Antibody ELISA vs. other ACA Screen ELISA:

		Other ACA Screen ELISA		
		Positive	Negative	Total
<b>IMMCO</b>	Positive	243	27	270
<b>ACA</b>	Negative	36	299	335
<b>Screen ELISA</b>	Total	279	326	605

Positive Percent Agreement: 87.1% (95% CI 80.5% - 90.7%)

Negative Percent Agreement: 91.7% (95% CI 88.0% - 94.4%)

Overall Percent Agreement: 89.6% (95% CI 86.8% - 91.9%)

Disease associated subjects (APS, SLE, APS with SLE, suspected APS and SLE): n=469

Disease controls: n=136

B. Cross Reactivity: A set of potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders and infection known to cross-react with cardiolipin were tested for ACA using the ACA Screen ELISA.

Condition	n Tested	n Pos	% Pos
Celiac disease	18	0	0.0%
Mixed connective tissue disease	15	1	6.7%
Myositis	2	0	0.0%
Rheumatoid arthritis	85	9	10.6%
Sjögren's syndrome	20	2	10.0%
Syphilis	40	39	97.5%
Systemic sclerosis	36	2	5.6%
Thyroiditis	8	0	0.0%
Vasculitis	8	0	0.0%



EN

### **Reproducibility**

14 assays of samples in the low negative range, positive for ACA in the moderate positive range, near the cutoff and approximately +/- 20% of the assay cutoff were performed to determine qualitative reproducibility. Assay results for the negative, +20% and moderate positive specimens produced 100% qualitative agreement. Assay results for the approximately -20% specimen produced 97% qualitative agreement. Assay results for the near cutoff specimen produced 79% 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 was determined to be 5.2 EU/ml.

### **Interference**

Interference was studied by mixing sera with known ACA levels 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).

# ImmULisa Enhanced™ Cardiolipin IgA/IgG/IgM Antibody (ACA) ELISA

Έλεγχος Αντισωμάτων Καρδιολιπίνης/Φωσφολιπιδίων ELISA

**IVD** Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

## ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

**REF** 5118S ACA Screen ELISA 96 Προσδιορισμοί

## ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ένα ένζυμο συνδέεται ανοσολογική δοκιμή (ELISA) για την ποιοτική ανίχνευση των Cardiolipin IgA, IgG και IgM αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό βοήθημα για τη διάγνωση του συνδρόμου anti-phospholipid (APS) και APS που συσχετίζονται με ερυθηματώδους λύκος (Εταιρείας), σε συνδυασμό με άλλες εργαστηριακών εξετάσεων και κλινικών ευρημάτων.

Προειδοποίηση: 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.<sup>1</sup> Ανιχνεύονται πρωτίστως από την δοκιμασία αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων (ACA), η ψευδώς-θετική δοκιμασία για σύφιλη και η 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 ταυτοποίηση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Η μορφή της δοκιμασίας ELISA είναι μια άκρως ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο παρατηρείται πιο συχνά σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE) ή νόσο τύπου λύκου όπου τα κριτήρια για τον SLE δεν πληρούνται.<sup>5-7</sup> Υψηλά επίπεδα αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων παρατηρούνται στη θρόμβωση, την απώλεια εμβρύου, τη θρομβοπενία και αρκετές άλλες διαταραχές.<sup>1-15</sup> Χαμηλά επίπεδα αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων διαπιστώνονται σε ποικιλία κλινικών διαταραχών που δεν σχετίζονται με το αντιφωσφολιπιδικό 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 αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο παρά με αντισώματα κατηγορίας IgM. Ωστόσο, τα αντισώματα IgM εμφανίζονται να επηρεάζονται περισσότερο από τη θεραπεία.<sup>5,10</sup>

## EL

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.<sup>8,10</sup>

## 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 σηματοδοτούμενο 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 ή 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 ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

## 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 φοράς. 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 μολυσματικά. Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για την αποθήκευση, χορήγηση και διάθεση αυτών των υλικών.<sup>16</sup>

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το φάτε και αποφύγετε 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 αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

**Οι οδηγίες θα πρέπει να τηρούνται ακριβώς όπως εμφανίζονται στο ένθετο του παρόντος kit για να διασφαλιστούν έγκυρα αποτελέσματα.** Μην εναλλάσσετε στοιχεία

## EL

του kit με εκείνα από άλλες πηγές. Τηρήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιήσετε μικροβιακή και αλληλο-μόλυνση αντιδραστηρίων κατά τον χειρισμό. Μην χρησιμοποιείτε στοιχεία του kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

### Υλικά που παρασχέθηκαν

ImmLiSa™ ACA Screen ELISA

**[REF]** 5118S

Το kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8 **[MICROPLATE|ACA]**

**Μικροπλάκα** με ατομική περίπτωση απόσπασης microwells. Επικαλυμμένο με cardioliipin αντιγόνου και βοοειδή ή ανθρώπινης B2GP1. Έτοιμη για χρήση.

1 x 1.75 ml **[CONTROL+|ACASCREEN]**

Έτοιμος προς χρήση **Θετικός Έλεγχος (Positive Control)** (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για ACA. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.

1 x 1.75 ml **[CONTROL-]**

Έτοιμος προς χρήση **Αρνητικός Έλεγχος (Negative Control)** (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.

1 x 1.75 ml **[CALIBRATOR|ACASCREEN]**

Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής (πράσινο πώμα) 30 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα ACA.

1 x 15 ml **[IgA/G/M-CONJ|HRP]**

Σύζευξη ορού ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης από υπεροξειδάση από ραφανίδα IgA/IgG/IgM. Έτοιμη προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.

1 x 60 ml **[DIL]**

Αραιωτικό ορού (Serum Diluent). Έτοιμη προς χρήση.

1 x 15 ml **[SUBSTRATE|TMB]**

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

1 x 15 ml **[STOP|H2SO4]**

Διάλυμα παύσης (Stop Solution). Έτοιμη προς χρήση.

2 x vials **[BUF|WASH]**

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

1 x

Φύλλα Πρωτοκόλλου









### Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60ml **[BUF|WASH]**

Υγρό Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης. **Ανασυνθέστε στο ένα λίτρο.**

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 πιπετών (pipette tips) μιας χρήσεως
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 mm και στηρίγματα δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομέτρης
- 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.
- **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

EL

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** Συνιστάται τα δείγματα να διανέμονται σύμφωνα με την παρακάτω διάταξη.

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

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 μυγείο. Τοποθετείτε ασφαλώς τα βυθίσματα στην επιπλέον βάση που παρέχεται.

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

**Σημείωση:** Συμπεριλαμβάνετε μία κοιλότητα που περιέχει **100 μl** Ορού Αραίωσης ως κενό αντιδραστήριο. Μηδενίζετε την συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του κενού αντιδραστηρίου.

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

**Βήμα 8** Πλένετε **4 φορές** με διάλυμα πλύσης. Για πλύσιμο με το χέρι, γεμίζετε κάθε βύθισμα με ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης. Πετάζτε το υγρό αναστρέφοντας και κτυπώντας ελαφρά ώστε να βγουν τα περιεχόμενα κάθε κοιλότητας ή αναρροφώντας 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 χειροπετεςέτες. 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** Επώάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

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

ΕΛ

**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** Επωάζετε για **30 λεπτά** ( $\pm$  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. Διαβάζετε τις τιμές απορροφητικότητας εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του Διαλύματος Παύσης.

**Βήμα 15** Διαβάστε την απορροφητικότητα κάθε βύθισματος 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

Ο Βαθμονομητής, 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 θα πρέπει να έχει ένδειξη απορροφητικότητας όχι μικρότερη του 0,2, άλλως η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει να είναι μικρότερος από 10 EU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, ο μέσος όρος των δύο ενδείξεων θα πρέπει να λαμβάνεται για τον προσδιορισμό EU/ml. Η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνην του αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορροφητικότητα του θετικού ελέγχου. Ο θετικός έλεγχος θα πρέπει να δίνει τιμές εντός του φάσματος που δηλώνεται στο φιαλίδιο.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υπολογισμοί

Οι πυκνότητες των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

#### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

$$\frac{\text{Απορ. του Δείγματος Δοκιμασίας}}{\text{Απορ. Βαθμονομητή}} \times \text{EU/ml Βαθμονομητή} = \text{EU/ml Δείγμα Δοκιμασίας}$$

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με 20 EU/ml θεωρούνται θετικά.

#### Βαθμονομητής

Ο Έτοιμος προς Χρήση Βαθμονομητής που περιλαμβάνεται πρέπει να χρησιμοποιείται σε κάθε εκτέλεση.

#### Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 64 απλών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου νόσου μη-αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Ο μέσος όρος των συνήθων αντικειμένων συν 2.75 SD καθιερώθηκε ως το έσχατο όριο της δοκιμασίας και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Οι ακόλουθες πληροφορίες εξυπηρετούν μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

EL

**Τιμή ACA**

**Ερμηνεία**

<20 EU/ml

Αρνητικό

>20 EU/ml

Θετικό

Η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι μπορεί να παρατηρηθούν χαμηλά επίπεδα θετικών αντισωμάτων αντικαρδιολιπίνης σε μια ποικιλία κλινικών διαταραχών που δεν σχετίζονται με το σύνδρομο αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Έτσι, σύμφωνα με τις συστάσεις των ερευνητών η διάγνωση του συνδρόμου αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, θα πρέπει να γίνονται μόνον όταν τα αποτελέσματα της δοκιμής είναι συγκρατημένα ή άκρως θετικά.<sup>14, 19</sup> Isotype-ειδικές ΣΕΔ τέτοιοι προσδιορισμοί υποχρεούνται να αξιολογούν χωριστά επίπεδα ΣΕΔ IgA, IgG και IgM αντισωμάτων. 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.<sup>20</sup>

**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 βάση μόνο 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. 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.<sup>17</sup>

Τα αντισώματα αντικαρδιολιπίνης έχουν επίσης συσχετισθεί με νευρολογικά σύνδρομα, όπως παροδικά ισχαιμικά επακόλουθα και ημικρανία.<sup>13</sup> 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.<sup>2-4</sup>

**ANAMENOMENES TIMES**

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

Επίπτωση του ΣΕΔ στο Εταιρείας<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

Isotype αντισωμάτων	Εταιρείας % επίπτωση	% APS επίπτωση
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Οποιοδήποτε ισότυπο	53	71



ΕΛ

Συσχέτιση της νόσου του ΣΕΔ <sup>22, 25-29</sup>

Προϋπόθεση	Συχνότητα %
Επαναλαμβανόμενων Venous θρόμβωση	28-71
Επαναλαμβανόμενα εμβρυϊκής απώλειας	28-64
Εγκάρσιο Myelitis	50
Αιμολυτική αναιμία	38
Thrombocytopenia	27-33
Αρτηριακή εμφράξεων	25-31
δικτυωτή πελίδνωση	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	n	ΟΠ	%
APS με άγνωστο καθεστώς ΣΕΔ	90	56	62,2%
APS με συμμετοχή της Εταιρείας και η κατάσταση Άγνωστος ΣΕΔ	66	60	90,9%
Οροί που υποβάλλεται σε δοκιμή APS ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ	185	38	20,5%
Οροί που υποβάλλεται σε δοκιμή Εταιρείας	74	24	32,4%
Thrombocytopenia	88	16	18,2%
Προεκλαμψία	15	2	13,3%
Άλλες ΕΝΙΣΧΥΣΕΙΣ *	15	3	20,0%
NHS	192	14	7,3%
	158	3	1,9%

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

### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του ImmuLisa Enhanced™ ΣΕΔ IgA/IgG/IgM αντισωμάτων ELISA αξιολογήθηκε από δοκιμές καλά που χαρακτηρίζεται δείγματα από θετικά θέματα Εταιρείας cardiolipin παράλληλα με ελέγχους των νόσων. Τα δείγματα αυτά δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA για κάθε isotype. Μόνο τα δείγματα στην γραμμική περιοχή του δοκιμίου περιλαμβάνονταν στη μέθοδο σύγκρισης. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται παρακάτω.

A. ImmuLisa βελτιωμένη™ ΣΕΔ IgA/IgG/IgM αντισωμάτων ELISA vs. άλλα ELISA οθόνη ΣΕΔ:

Άλλη οθόνη ΣΕΔ ELISA				
IMMCO	Θετική	Θετική	Αρνητική	Συνολικά
ΣΕΔ	243	27	270	
Οθόνη ELISA	Αρνητική	36	299	335
	Συνολικά	279	326	605

Θετική συμφωνία επί τοις εκατό: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Αρνητικό ποσοστό συμφωνίας: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Συνολικό ποσοστό συμφωνίας: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Ασθένεια που συνδέεται θέματα (APS, Εταιρείας, APS με Εταιρείας, ύποπτες APS και Εταιρείας): n=469

Ελέγχους των νόσων: n=136

## ΕΛ

Β. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο από δυνητικά cross-reactive δείγματα από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές και λοίμωξη γνωστή στο cross-react με cardiolipin ελέγχθηκαν για ΣΕΔ χρησιμοποιώντας το ΣΕΔ οθόνη ELISA.

Προϋπόθεση	η που δοκιμάστηκαν	ν ΟΠ	ΟΠ %
Δυσανεξία γλουτένης νόσου	18	0	0.0%
Νόσου μεικτών συνδετικού ιστού	15	1	6.7%
Μυοσίτιδα	2	0	0.0%
Ρευματοειδή αρθρίτιδα	85	9	10.6%
Σύνδρομο Sjögren του	20	2	10.0%
Σύφιλη	40	39	97.5%
Συστημική σκλήρυνση	36	2	5.6%
θυρεοειδίτιδα	8	0	0.0%
Χοριοεπιδερμικά ρήγματα	8	0	0.0%

### Αναπαραγωγιμότητα

14 τέτοιοι προσδιορισμοί των δειγμάτων σε χαμηλή περιοχή αρνητικών, θετική για ΣΕΔ στην μέτρια θετική περιοχή, κοντά στο όριο αποκοπής, προκειμένου η και ασκούσε περίπου +/-20% του δοκιμίου αποκοπής για τον καθορισμό ποιοτικών αναπαραγωγιμότητας. Ποσοτικός προσδιορισμός αποτελεσμάτων για τα αρνητικά, + 20% και μέτρια θετικά δείγματα παράγονται ποιοτικά συμφωνία 100%. Ποσοτικός προσδιορισμός αποτελεσμάτων για τα-περίπου 20% υπόδειγμα παράγονται ποιοτικά συμφωνία 97%. Ποσοτικός προσδιορισμός αποτελεσμάτων για το εγγύς αποκοπής υπόδειγμα παράγονται ποιοτικά συμφωνία 79%.

### Όριο Ανίχνευσης

Τα όρια ανίχνευσης (LoD) για αντισώματα ACA επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS) καθορίστηκαν να είναι 5,2 EU/ml.

### Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα ACA 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).

# ImmULisa Enhanced™

# Cardiolipin IgA/IgG/IgM

# Antibody (ACA) ELISA

## ELISA Anticuerpos anticardiolipina/antifosfolípidos

**IVD** Para utilización de diagnóstico *in vitro*

### ETIQUETA DEL PRODUCTO

**REF** 5118S    ACA Screen ELISA    96 Determinaciones

### UTILIZACIÓN PREVISTA

Un enzyme linked immunoassay (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos contra cardiolipina IgA, IgG e IgM 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 han 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.<sup>1</sup> Se detectan principalmente a través del análisis de anticuerpos anticardiolípidos (ACA), el análisis 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.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> 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.<sup>5-7</sup> Se dan unos niveles altos de anticuerpos anticardiolipina con la trombosis, pérdida fetal, trombocitopenia y otras enfermedades.<sup>1-15</sup> Se dan unos niveles bajos de anticuerpos anticardiolipina en pacientes con una 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.

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.<sup>5,10</sup> Podemos observar unos niveles bajos de anticuerpos IgM en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide,

ES

principalmente el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso inducido por fármacos, la enfermedad de Lyme y la sífilis.<sup>8,10</sup>

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Antígeno de cardioplipina como B2GP1 así como bovino y humano está enlazado a los pocillos de una microplaca de poliestireno seguido por bloqueo de los sitios no reaccionados para reducir la fijación no específica. Suero diluido del paciente, calibradores y controles se agrega para separar wells, permitiendo que presenta cualquier anticuerpo cardioplipina para enlazar a los antígenos inmovilizados. Muestra independiente es arrasado y se agrega una enzima etiquetada anti-IgA/IgG/IgM conjugado a cada pocillo. Estos anticuerpos enzima conjugada se unen específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase apropiada. Después de lavar cualquier conjugado, luego se añade el sustrato de la enzima específica (TMB) a los pocillos. Después de parar la reacción enzimática, la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, se lee en un espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades de ELISA por mililitro (EU/ml).

## 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.<sup>16</sup>

La solución de parada es una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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.

ES

## Materiales proporcionados

ImmLiSa™ ACA Screen ELISA

**REF** 5118S

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 96 determinaciones.

12 x 8

**MICROPLATE**|**ACA**

Microplaca con micropocillos disidentes individuales. Recubiertas de antígeno de cardioplipina y bovino o humano B2GP1. Listo para usar.

1 x 1.75 ml

**CONTROL**|**+**|**ACASCREEN**

**Control Positivo** listo para su utilización (*tapón rojo*). Contiene suero humano positivo en ACA. El registro de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.

1 x 1.75 ml

**CONTROL**|**-**

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

1 x 1.75 ml

**CALIBRATOR**|**ACASCREEN**

**Calibrador** listo para su utilización (*tapón verde*) 30 EU/ml. Proveniente de suero humano con ACA.

1 x 15 ml

**IgA/IgM-CONJ**|**HRP**

**Conjugado IgA/IgG/IgM** antihumano de cabra HRP. 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. Listo 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

## ES

- 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 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** Es recomendable que las muestras se preparen de acuerdo con el cuadro siguiente.

ES

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

- Paso 4** Prepare una dilución **1:101** de las mezclas del paciente mezclando **5 µl** del suero del paciente con **500ul** de Diluyente de Suero.
- 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 Calibrador listo 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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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

El Calibrador, 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 debería tener una lectura de absorbencia de no menos de 0,2, de lo contrario la prueba debe repetirse. El control negativo debe ser  $<10$  EU/ml. Si se realiza la prueba por duplicado, debería tomarse la media de ambas lecturas para determinar la lectura en EU/ml. La densidad óptica del Calibrador debe ser mayor que la del control negativo y menor que la absorbencia del control positivo. El control positivo debe arrojar valores dentro del registro estipulado en el vial.

ES

## RESULTADOS

### Cálculos

Las concentraciones de las muestras del paciente pueden ser determinadas utilizando la fórmula siguiente:

#### DETERMINACIÓN CUALITATIVA

$$\frac{\text{Abs. muestra de análisis}}{\text{Abs. de Calibrador}} \times \text{EU/ml de Calibrador} = \text{EU/ml Muestra Análisis}$$

Es recomendable indicar si los resultados cualitativos son “positivos” o “negativos”. Los resultados de los análisis iguales o superiores a 20 EU/ml son considerados positivos.

### Calibrador

Debe utilizarse el calibrador listo para utilizar en cada análisis.

### Interpretación

Los valores de interpretación fueron determinados analizando 64 especímenes de control de donantes de sangre normales y sin síndrome antifosfolípido. La media de los sujetos normales más 2,75 SD fue establecida como límite del ensayo y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. La información siguiente sirve únicamente como guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

<u>Valor ACA</u>	<u>Interpretación</u>
<20 EU/ml	Negativo
≥20 EU/ml	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.<sup>14,19</sup> Isotipo específicos ACA ensayos son necesarios para evaluar los niveles de anticuerpos IgA de ACA, IgG o IgM separados. 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.<sup>20</sup>

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo ELISA ImmuLisa™ para detección de 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 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



## ES

sífilis pueden presentar unos niveles de ACA elevados. Para descartar la sífilis deben realizarse análisis de confirmación.<sup>17</sup>

Los anticuerpos anticardiolipina también se han asociado a síndromes neurológicos como efectos isquémicos pasajeros y la migraña.<sup>13</sup> 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.<sup>2-4</sup>

## VALORES ESPERADOS

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

Incidencia de ACA en SLE<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

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

Asociación de enfermedad de ACA<sup>22, 25-29</sup>

Condición	% De 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 el ensayo ELISA ImmuLisa™ para detección de ACA. A continuación incluimos unos resultados que demuestran la incidencia en la población para este estudio:

Categoría	n	pos	%
APS con estado desconocido de ACA	90	56	62,2%
APS con estado de SLE participación y desconocido ACA	66	60	90,9%
Sera presentado para APS prueba SLE	185	38	20,5%
Sera presentado para APS prueba SLE	74	24	32,4%
Sera presentado para la prueba SLE	88	16	18,2%
Trombocitopenia	15	2	13,3%
Preeclampsia	15	3	20,0%
Otras ayudas*	192	14	7,3%
NHS	158	3	1,9%

\*Otras enfermedad autoinmune incluye enfermedad celíaca, Miositis, artritis reumatoide, esclerodermia, tiroiditis y vasculitis.

ES

## CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La utilidad de los anticuerpos de IgA/IgG/IgM ImmuLisa mejorada de <sup>TM</sup> ACA ELISA fue evaluada por análisis de muestras bien caracterizadas de cardioplipina temas positivos de SLE junto con controles de la enfermedad. Estas muestras se analizaron también en kits de ELISA comercialmente disponibles para cada isotipo. Sólo las muestras en el rango lineal del ensayo fueron incluidas en la comparación del método. Estos resultados se resumen a continuación.

A. ImmuLisa mejorado <sup>TM</sup> ACA IgA/IgG/IgM anticuerpos ELISA vs otros ELISA de pantalla ACA:

		Otra pantalla ACA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	243	27	270
ACA	Negativo	36	299	335
Pantalla ELISA	Total	279	326	605

Positivo porcentaje de coincidencia: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Acuerdo por ciento negativo: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Total porcentaje de coincidencia: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Enfermedad asociada sujetos (APS, SLE, APS con SLE, sospecha APS y SLE):  
n=469

Controles de la enfermedad: n=136

B. Cruz reactividad: Un conjunto de muestras potencialmente interferentes de individuos con otras enfermedades autoinmunes y la infección conocida por reacción cruzada con cardioplipina fueron probados por ACA con el ELISA de pantalla ACA.

Condición	n probado	Pos n	Pos %
Enfermedad celíaca	18	0	0,0%
Enfermedad mixta del tejido	15	1	6,7%
Miositis	2	0	0,0%
Artritis reumatoide	85	9	10,6%
Síndrome de Sjögren	20	2	10,0%
Sífilis	40	39	97,5%
Esclerosis sistémica	36	2	5,6%
Tiroiditis	8	0	0,0%
Vasculitis	8	0	0,0%

### Reproducibilidad

14 ensayos de muestras en el rango negativo, positivo para ACA en el rango positivo moderado, cerca del corte y se realizaron aproximadamente +20% de la prueba de corte para determinar la reproducibilidad cualitativa. Resultados del análisis de las muestras positivas, negativas, + 20% y moderado producen Acuerdo cualitativo de 100%. Análisis de resultados para el-aproximadamente 20% muestra producido Acuerdo cualitativo de 97%. Resultados del análisis de la muestra cerca de corte producen Acuerdo cualitativo de 79%.

### Límite de detección

En base a 60 duplicados de la base y 10 duplicados de 6 muestras de nivel bajo (NHS), se determinaron unos límites de detección para los anticuerpos ACA de 5,2EU/ml.

ES

**Interferencia**

La interferencia fue estudiada mezclando sueros con niveles de ACA conocidos 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  $\mu$ mol/L), Factor Reumatoide (100 EU/ml, Triglicéridos (37 mmol/L), y Colesterol (13 mmol/L).

ImmuLisa Enhanced™

# Cardiolipin IgA/IgG/IgM Antibody (ACA) ELISA

Cardiolipin/Phospholipid Antikörper-Screen-ELISA

**IVD** Für *in vitro* diagnostischen Gebrauch

## PRODUKTBEILAGE

**REF** 5118S    ACA Screen ELISA    96 Bestimmungen

## VERWENDUNGSZWECK

Ein Enzym verknüpft Immunoassay (ELISA) für den qualitativen Nachweis von Cardiolipin IgA, IgG und IgM-Antikörpern im menschlichen Serum bei der Diagnose von Phospholipid-Syndrom (APS) und APS mit systemischem Lupus erythematodes (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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> Das Antiphospholipid-Syndrom tritt am meisten bei Patienten mit dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder einer Lupus ähnlichen Krankheit auf, wo die Kriterien für SLE nicht erfüllt sind.<sup>5-7</sup> Hohe Spiegel von Antikardiolipin-Antikörpern treten bei Thrombose, Abort, Thrombozytopenie und mehreren anderen Erkrankungen auf.<sup>1-15</sup> 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.<sup>5,10</sup> Niedrige Spiegel von IgM Antikörpern können bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. Rheumatoidarthritis, primärem

DE

Sjögren-Syndrom, drogeninduzierter Lupus erythematodes, Lyme-Krankheit und Syphilis identifiziert werden.<sup>8,10</sup>

## GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Cardiolipin-Antigen als auch Rinder und menschlichen B2GP1 ist an die Kavitäten einer Mikrotiter-Platte gefolgt von Spurenverunreinigungen Websites blockieren gebunden, um unspezifische Bindung zu reduzieren. Steuerelemente, Kalibrator und verdünnten Patientenseren hinzugefügt trennen Brunnen, so dass alle Cardiolipin-Antikörper binden an die gebundenen Antigene zu präsentieren. Waschen entfernt und ein Enzym mit der Bezeichnung Anti-Human-IgG/IgA/IgM-Konjugat hinzugefügt in jede Mulde. Diese Enzym konjugiert-Antikörper binden, speziell auf die menschliche Immunglobulin der entsprechenden Klasse. Nach dem Waschen entfernt alle ungebundenes Konjugat, ist spezifische Enzym-Substrat (TMB) dann die Brunnen hinzugefügt. Nach dem Absetzen der enzymatischen Reaktion, wird die Intensität der Farbänderung, die proportional zur Konzentration des Antikörpers, gelesen von einem Spektrophotometer bei 450 nm. Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt.

## REAGENZIEN

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.<sup>16</sup>

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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.

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.

DE

## Bereitgestellte Materialien

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA

**REF** 5118S






Kits enthalten ausreichende Reagenzien, um 96 Bestimmungen auszuführen.

<b>12 x 8</b>	<b>MICROPLATE ACA</b>	Mikroplatten mit einzelnen Abbrünnigen Inkubation. Beschichtet mit Cardiolipin-Antigen und Rindern/menschlichen B2GP1. Einsatzbereit.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CONTROL+ ACASCREEN</b>	Einsatzbereite <b>Positivkontrolle</b> (roter Verschlussdeckel) Enthält für ACA positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CONTROL-</b>	Einsatzbereite <b>Negativkontrolle</b> (weißer Verschlussdeckel). Enthält Humanserum.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CALIBRATOR ACASCREEN</b>	Einsatzbereiter Kalibrator (grüne Kappe) 30 EU/ml. Abgeleitet von Humanserum, das ACA enthält.
<b>1 x 15 ml</b>	<b>IgA/G/M-CONJ HRP</b>	HRP Ziege anti-menschliches IgA/IgG/IgM Konjugat. Gebrauchsfertig. Farbcode rosa.
<b>1 x 60 ml</b>	<b>DIL</b>	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig.
<b>1 x 15 ml</b>	<b>SUBSTRATE TMB</b>	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. <b>Vor Licht schützen.</b>
<b>1 x 15 ml</b>	<b>STOP H2SO4</b>	Stopp-Lösung. Gebrauchsfertig.
<b>2 x Phiole</b>	<b>BUF WASH</b>	Pulver Waschpuffer. <b>Zu je einem Liter wiederherstellen.</b>
<b>1 x</b>		Protokollblätter

## Optionale Komponenten

<b>1 x 60 ml</b>	<b>BUF WASH</b>	Flüssigkeit konzentrierter Waschpuffer. <b>Zu einem Liter herstellen.</b>
------------------	-----------------	---

## Symbole auf den Etiketten

<b>LOT</b>	Patientennummer
<b>REF</b>	Katalognummer
<b>IVD</b>	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

## DE

- Saubere Reagenzgläser 12 x 75 mm und Reagenzglasgestell
- Zeitmesser
- Saugfähige Papierhandtücher
- 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** Es wird empfohlen, diese Proben gemäß dem nachstehenden Layout zu dispensieren.

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

- Schritt 4** **1:101** Verdünnung der Patientenproben durch Mischen von **5 µl** der Patientenserum 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** des einsatzbereiten Kalibrators, 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** ( $\pm 5$  Minuten) 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** ( $\pm 5$  Minuten) 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** ( $\pm 5$  Minuten) 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

Kalibrator, Positiv- und Negativkontrollen und eine Reagenz-Leerprobe müssen mit jeder Prüfung eingesetzt werden, um die Vollständigkeit und Genauigkeit des Tests zu verifizieren. Die Absorptionsanzeige der Reagenz-Leerprobe sollte  $<0,3$  sein. Der



## DE

Kalibrator sollte eine Absorptionsanzeige von nicht weniger als 0,2 aufweisen, anderweitig muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss <10 EU/ml sein. Wenn der Test als zweifache Ausführung durchgeführt wird, sollte der Mittelwert der zwei Messdaten aufgenommen werden, um EU/ml zu bestimmen. Die optische Dichte von Kalibrator D muss größer sein als die der Negativkontrolle und kleiner als die Absorption der Positivkontrolle. Die Positivkontrolle sollte Werte im auf dem Fläschchen angegebenen Bereich ergeben.

## RESULTATE

### Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können unter Verwendung der folgenden Formel bestimmt werden:

#### QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Abs. des Prüfmuster}}{\text{Abs. des Kalibrator}} \times \text{EU/ml von Kalibrator} = \text{EU/ml Prüfmuster}$$

Es wird empfohlen, dass qualitative Ergebnisse, als „positiv“ oder „negativ“ berichtet werden. Probenergebnisse größer oder gleich 20 EU/ml werden als positiv betrachtet.

### Kalibrator

Der enthaltene einsatzbereite Kalibrator muss mit jedem Durchgang verwendet werden.

### Ausdeutung

Die Ausdeutungswerte wurden durch Prüfen von 64 normalen Blutspendern und Nicht-Antiphospholipid-Syndrom-Krankheitsbekämpfungsproben bestimmt. Der Mittelwert des normalen Probanden plus 2,75 SD wurde als der Prüfungs-Cutoff ermittelt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Die folgende Information dient nur als eine Führung in der Ausdeutung der Laborresultate. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte bestimmen.

<u>ACA-Wert</u>	<u>Ausdeutung</u>
<20 EU/ml	Negativ
≥20 EU/ml	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 folglich nur vornehmen, wenn die Prüfergebnisse mäßig oder sehr positiv sind.<sup>14,19</sup>

Isotype-spezifische ACA Assays sind separate ACA IgA, IgG und IgM-Antikörper-Ebenen zu prüfen. 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.<sup>20</sup> zugeordnet

## BEGRENZUNGEN DES VERFAHRENS

Der ImmuLisa™ ACA Screen ELISA 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

## DE

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.<sup>17</sup>

Antikardiolipin-Antikörper sind ebenfalls mit neurologischen Syndromen wie z. B. vorübergehende ischämische Wirkungen und Migräne assoziiert worden.<sup>13</sup> 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.<sup>2-4</sup>

## ERWARTETE WERTE

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

Inzidenz von ACA in SLE<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

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

Krankheitsassoziation von ACA<sup>22, 25-29</sup>

Bedingung	% Inzidenz
Rezidivierende venöse Thrombose	28-71
Wiederkehrende fetale Verlust	28-64
Transversale Myelitis	50
Hämolytische Anämie	38
Thrombozytopenie	27-33
Arterielle Gefäßverschlüsse	25-31
Livedo Reticularis	25
Pulmonale Hypertonie	20-40

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

Kategorie	n	pos	%
APS mit ACA-Status unbekannt	90	56	62,2%
APS mit SLE-Beteiligung und unbekannt-ACA-status	66	60	90,9%
Seren für Tests des APS eingereicht	185	38	20,5%
SLE	74	24	32,4%
Seren für SLE Tests eingereicht	88	16	18,2%
Thrombozytopenie	15	2	13,3%
Präeklampsie	15	3	20,0%
Sonstige Beihilfen *	192	14	7,3%
NHS	158	3	1,9%

DE

\* Andere Autoimmun-Krankheit enthält, Zöliakie, Myositis, rheumatoide Arthritis, Sklerodermie, Thyreoiditis und Vaskulitis

### LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Das Dienstprogramm des ImmuLISA Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM-Antikörper ELISA wurde durch Testen gut charakterisierten Proben von Cardiolipin positiven SLE Probanden neben Krankheit Steuerelemente ausgewertet. Diese Proben wurden auch auf kommerziell erhältlichen ELISA-Kits für jedes Isotype getestet. Nur Exemplare im linearen Bereich des Assays wurden in der Methode Vergleich einbezogen. Diese Ergebnisse sind unten zusammengefasst.

A. ImmuLISA Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM-Antikörper ELISA vs. andere ACA Screen ELISA:

Andere ACA Screen ELISA				
		Positiv	Negativ	Gesamt
<b>IMMCO</b>	Positiv	243	27	270
<b>ACA</b>	Negativ	36	299	335
<b>Bildschirm ELISA</b>	Gesamt	279	326	605

Positive prozentuale Übereinstimmung: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Negative prozentuale Übereinstimmung: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Insgesamt prozentuale Übereinstimmung: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Krankheit, die Themen (SLE, APS, APS mit SLE, vermutete APS und SLE):  
n=469

Krankheit-Steuerelemente: n=136

B. Cross Reaktivität: Eine Reihe von potenziell kreuzreagierenden Proben von Personen mit anderen Autoimmunerkrankungen und Infektionen, die bekanntermaßen mit Cardiolipin cross-react wurden für ACA mit ACA Screen ELISA getestet.

Bedingung	n		
	getestet	n Pos	% Pos
Zöliakie	18	0	0,0%
Mischkollagenose	15	1	6,7%
Myositis	2	0	0,0%
Rheumatoide arthritits	85	9	10,6%
Sjögren-Syndrom	20	2	10,0%
Syphilis	40	39	97,5%
Systemische Sklerose	36	2	5,6%
Thyreoiditis	8	0	0,0%
Vaskulitis	8	0	0,0%

### Reproduzierbarkeit

14 Proben Proben im niedrigen negativen Bereich, positiv für ACA im moderaten positiven Bereich, nahe der Cut-Off und ca. +/-20 % des cutoff Tests wurden durchgeführt, um die qualitativen Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Untersuchungsergebnisse für die Negative, + 20 % und moderat positiven Proben produziert 100 % qualitative Vereinbarung. Ergebnisse für die Bestimmung der etwa-20 % Exemplar produziert 97 % qualitative Vereinbarung. Untersuchungsergebnisse für das nahe cutoff Exemplar produziert 79 % qualitative Vereinbarung.

DE

### **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: 5,2 EU/ml.

### **Interferenz**

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



# ImmLiSa Enhanced™

## Cardiolipin IgA/IgG/IgM Antibody (ACA) ELISA

### ELISA Dépistage Anticorps Cardiolipide / Phospholipide

**IVD** Pour utilisation à diagnostic *in vitro*

#### DESCRIPTION DU PRODUIT

**REF** 5118S    ACA Screen ELISA    96 Déterminations

#### UTILISATION VISÉE

Une enzyme linked immuno-essai (ELISA) pour la détection qualitative d'anticorps anti-cardiolipine IgA, IgG et IgM dans le sérum humain dans le diagnostic du syndrome des anti-phospholipides (SAP) 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> Le syndrome des anti-phospholipides survient le plus souvent chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) ou d'autres maladies de type lupus dans lesquelles les critères pour le diagnostic d'un LED ne sont pas satisfaits.<sup>5-7</sup> De hauts niveaux d'anticorps anti-cardiolipides sont constatés dans les cas de thromboses, pertes fœtales, thrombocytopénie ou autres troubles.<sup>1-15</sup> 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.

FR

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.<sup>5,10</sup> 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 lié aux médicaments, la maladie de Lyme et la syphilis.<sup>8,10</sup>

## PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

L'antigène cardiolipidique comme B2GP1 bovine et humaine est lié aux puits d'une plaque de microtitration suivie en bloquant les sites n'ayant pas réagis pour réduire les liaisons non spécifiques. Contrôles, calibrateur et sérums de patients dilués sont ajoutés pour séparer les puits, permettant à n'importe quel anticorps anti-cardiolipine présents pour lier à l'antigène immobilisé. Échantillon est lavé et une enzyme étiquetée anti-IgA/IgG/IgM conjugué est ajoutée à chaque puits. Ces anticorps enzyme conjugué se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après emportant tout conjugué non fixé, substrat de l'enzyme spécifique (TMB) est ensuite ajouté dans les puits. Après l'arrêt de la réaction enzymatique, l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration des anticorps, est lu par un spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitre (EU/ml).

## 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. Veuillez suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors du stockage, de la délivrance et de l'élimination de ces matériaux.<sup>16</sup>

La solution d'arrêt est une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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.

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.

FR

## Matériel fourni

ImmLiSa™ ACA Dépistage ELISA

**REF** 5118S






Les kits contiennent suffisamment de réactifs pour effectuer 96 déterminations.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>ACA</b>	Microplaque avec chaque micropuits sécessionniste. Recouvertes d'antigène cardiolipidique et bovine/humain B2GP1. Prêt à l'emploi.
1 x 1.75 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>ACASCREEN</b>	Contrôle Positif <b>Prêt à être utilisé</b> ( <i>bouchon rouge</i> ). Contient du sérum humain testé positif pour les ACA. La concentration qui est attendue est inscrite sur l'étiquette en EU/ml.
1 x 1.75 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b>	Contrôle Négatif <b>prêt à l'emploi</b> ( <i>capsule blanche</i> ). Contient du sérum humain.
1 x 1.75 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>ACASCREEN</b>	Calibreur prêt à l'emploi ( <i>capsule verte</i> ) 30 EU/ml. Dérivé de sérum humain contenant des ACA.
1 x 15 ml	<b>IgA/G/M-CONJ</b>   <b>HRP</b>	Globuline de chèvre anti-IgA/IgG/IgM humaine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP). Prête à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b>	Diluant sérum. Prête à l'emploi.
1 x 15 ml	<b>SUBSTRATE</b>   <b>TMB</b>	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'emploi. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 15 ml	<b>STOP</b>   <b>H2SO4</b>	Solution d'arrêt. Prête à l'emploi.
2 x fioles	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	Tampon de Lavage en Poudre. <b>Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre chacun.</b>
1 x		Feuille de Protocole

## Éléments Additionnels

1 x 60ml	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	Tampon de Lavage Liquide concentré. <b>Reconstituer jusqu'à un volume d'un litre.</b>
----------	--------------------------	---

## Symboles utilisés sur les étiquettes

<b>LOT</b>	Numéro de lot
<b>REF</b>	Numéro Catalogue
<b>IVD</b>	Utilisation pour un diagnostic in vitro
	Utiliser avant
	Température de stockage
	Lire les instructions avant utilisation
	Nombre de tests
	Fabriquant

## 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

## FR

- 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

## COLLECTE ET MANIPLICATION 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** Il est recommandé que les échantillons soient disposés selon la disposition proposée ci-dessous.



A	Vierge	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	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 Calibreur prêt 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** ( $\pm 5$  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 fabricant.
- Étape 9** Verser à l'aide d'une pipetteur **100 µl** de Conjugué dans les micropuits.
- Étape 10** Laisser incuber **pendant 30 minutes** ( $\pm 5$  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 pipetteur **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** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.
- Étape 14** Verser à l'aide d'un pipetteur **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

Le Calibreur, 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 ne doit pas être inférieure à 2,0 ; sinon le test devra être répété. Le contrôle négatif doit être  $<10$  EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux valeurs doit être prise en

FR

compte pour déterminer le nombre d'Unités Elisa/ml. La densité optique du Calibreur doit être supérieure à celle du contrôle négatif et son absorbance doit être inférieure à celle du contrôle positif. 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 en utilisant la formule suivante :

#### DETERMINATION QUANTITATIVE

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon Test}}{\text{Abs. du Calibreur}} \times \text{EU/ml du Calibreur} = \text{EU/ml de l'échantillon Test}$$

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient signalés comme « positif » ou « négatif ». Les résultats d'échantillon supérieurs ou égaux à 20 EU/ml sont considérés comme positifs.

### Calibreur

Le Calibreur Prêt à l'Emploi inclus doit être utilisé à chaque exécution.

### 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, à laquelle sont ajoutés 2,75 écarts types, a été établie comme limite de l'analyse et la valeur de 20 EU/ml lui a été attribuée. Les informations suivantes servent seulement de guide pour l'interprétation des résultats laboratoires. Chaque laboratoire doit déterminer les valeurs normales qui lui sont propres.

<u>Valeur ACA</u>	<u>Interprétation</u>
<20 EU/ml	Négatif
≥20 EU/ml	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 anti-phospholipides doit être effectué lorsque les résultats sont modérément ou clairement positifs.<sup>14,19</sup>

Dosages ACA isotype-spécifiques sont nécessaires pour évaluer des niveaux distincts de ACA IgA, IgG ou IgM anticorps. Il est suggéré que > 40 unités GPL ou MPL utilisées pour 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.<sup>20</sup>

## LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Le test ImmuLisa™ ACA Dépistage ELISA 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 isotopes 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

## FR

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.<sup>17</sup>

Les anticorps anti-cardiolipides ont aussi été associés à des syndromes neurologiques tels que les accidents ischémiques transitoires ou les migraines.<sup>13</sup> 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.<sup>2-4</sup>

## VALEURS ATTENDUES

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

Incidence de l'ACA dans SLE<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

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

Association de la maladie d'ACA<sup>22, 25-29</sup>

Condition	% D'incidence
Thrombose veineuse récurrente	28-71
Récurrente de mort foetale	28-64
Myélite transverse	50
Anémie hémolytique	38
Thrombocytopenie	27-33
Occlusions artérielles	25-31
Livedo Reticularis	25
Hypertension artérielle pulmonaire	20-40

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

Catégorie	n	pos	%
APS avec statut inconnu d'ACA	90	56	62,2%
Points d'accès et la participation de SLE et statut inconnu d'ACA	66	60	90,9%
Sérums soumis à des essais d'APS	185	38	20,5%
SLE	74	24	32,4%
Sérums soumis à des essais de SLE	88	16	18,2%
Thrombocytopenie	15	2	13,3%
Prééclampsie	15	3	20,0%
Autres aides *	192	14	7,3%
NHS	158	3	1,9%

FR

\*D'autres maladies auto-immunes comprend la maladie coeliaque, myosite, polyarthrite rhumatoïde, sclérodermie, thyroïdite et vascularite

## CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

L'utilité de l'Enhanced Immulisa™ ACA IgA/IgG/IgM anticorps ELISA a été évaluée en testant des échantillons bien caractérisés de cardiolipine sujets SLE positifs aux côtés de contrôles des maladies. Aussi, ces échantillons ont été testés sur des kits ELISA commercialement disponibles pour chaque isotype. Seuls les échantillons dans la gamme linéaire du dosage ont été inclus dans la comparaison entre les méthodes. Ces résultats sont résumés ci-dessous.

A. Immulisa Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM ELISA anticorps vs autres écran ACA ELISA :

		Autre ELISA ACA Screen		
		Positif	Négatif	Total
<b>IMMCO</b>	Positif	243	27	270
<b>ACA</b>	Négatif	36	299	335
<b>Écran ELISA</b>	Total	279	326	605

Pourcentage de concordance positif: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Pourcentage de concordance négatif: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Pourcentage global de concordance: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Maladie associés sujets (APS, SLE, APS avec SLE, présumés APS et SLE): n=469

Contrôle de la maladie: n=136

B. Réactivité croisée de B.: Un ensemble d'échantillons potentiellement une réaction croisées des personnes atteintes d'autres maladies auto-immunes et infection connue pour provoquer une réaction croisée avec la cardiolipine ont été testés pour ACA en utilisant l'écran ACA ELISA.

Condition	Testé n	Pos n	Pos %
Maladie coeliaque	18	0	0,0%
Connectivite mixte	15	1	6,7%
Myosite	2	0	0,0%
Polyarthrite rhumatoïde	85	9	10,6%
Syndrome de Gougerot-Sjögren	20	2	10,0%
Syphilis	40	39	97,5%
Sclérodermie systémique	36	2	5,6%
Thyroïdite	8	0	0,0%
Vascularite	8	0	0,0%

## Reproductibilité

14 essais sur des échantillons dans le bas de gamme négatif, positif pour l'ACA dans la gamme moyenne positive, près de la fréquence de coupure et environ +/-20 % de l'essai de coupure ont été effectuées pour déterminer la reproductibilité qualitative. Résultats d'analyse pour les échantillons positifs, négatifs, + 20 % et modérée produit 100 % d'accord qualitatif. Analyse des résultats pour l'environ -20 % échantillon produit 97 % accord qualitatif. Résultats d'analyse pour le spécimen près de coupure a produit 79 % 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 a été déterminée à 5,2 EU/ml.

FR

### **Interférence**

L'interférence a été étudiée en mélangeant le sérum avec des niveaux d'anticorps ACA connus 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  $\mu\text{mol/L}$ ), Facteur rhumatoïde (100 EU/ml), Triglycérides (37 mmol/L), et Cholestérol (13 mmol/L).

# ImmuLisa Enhanced™

# Cardiolipin IgA/IgG/IgM

# Antibody (ACA) ELISA

## ELISA screening anticorpi anticardiolipina/antifosfolipidi

**IVD** Per uso diagnostico in vitro

### FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

**REF** 5118S      ACA Screen ELISA      96 determinazioni

### USO PREVISTO

Un enzyme linked immunoassay (ELISA) per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti-cardiolipina IgA, IgG e IgM nel siero umano per aiutare nella diagnosi di sindrome fosfolipidica (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 anti-cardiolipina (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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> 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.<sup>5-7</sup> Livelli elevati degli anticorpi anticardiolipina sono presenti nei casi di trombosi, perdita fetale, trombocitopenia e numerosi altri disturbi.<sup>1-15</sup> 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.

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.<sup>5,10</sup> Bassi livelli di anticorpi IgM possono essere identificati in altre malattie autoimmuni come ad esempio

## IT

artrite reumatoide, sindrome di Sjögren primaria, lupus eritematoso iatrogeno, malattia di Lyme e sifilide.<sup>8,10</sup>

### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'antigene cardioplipina come B2GP1 così come bovino e umano è associato ai pozzetti di una piastra microtiter di polistirene seguita da blocco dei siti non reagiti per ridurre il legame non specifico. Controlli, calibratore e sieri vengono aggiunti ai pozzetti, consentendo che eventuali anticorpi cardioplipina presentano di legarsi all'antigene adsorbito. Campione non legato è lavato via e viene aggiunto un enzima etichettato IgA/IgG/IgM coniugato in ogni pozzetto. Questi anticorpi enzima coniugato si legano specificamente per le immunoglobuline umane di classe appropriata. Dopo aver lavato via ogni coniugato non associato, substrato enzima specifico (TMB) viene quindi aggiunto ai pozzetti. Dopo l'arresto della reazione enzimatica, l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpi, è letto da uno spettrofotometro a 450 nm. Risultati sono espressi in unità di ELISA per millilitro (UE/ml).

### 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 risigillate 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.<sup>16</sup>

La soluzione di arresto è costituita da acido solforico diluito. L'acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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.

### Materiali forniti

ImmuLISA™ ACA Screen ELISA

**REF** 5118S

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 96 determinazioni.

**12 x 8** **MICROPLATE|ACA**

Micropiastra con singoli pozzetti separatista. Rivestite di antigene cardioplipina e B2GP1 bovina o umana. Pronto per l'uso.









IT

1 x 1.75 ml	<b>CONTROL+ ACASCREEN</b>	<b>Controllo positivo</b> , pronto per l'uso ( <i>tappo rosso</i> ). Contiene siero umano positivo per ACA. L'intervallo di concentrazione previsto in UE/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1.75 ml	<b>CONTROL-</b>	<b>Controllo negativo</b> , pronto per l'uso ( <i>tappo bianco</i> ). Contiene siero umano.
1 x 1.75 ml	<b>CALIBRATOR ACASCREEN</b>	Calibratore (tappo verde) pronto all'uso 30 UE/ml. Derivato da siero umano contenente ACA.
1 x 15 ml	<b>IgA/G/M-CONJ HRP</b>	Coniugato HRP di montone anti IgA/IgG/IgM umane. Pronto per l'uso. Colore codificato rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b>	Diluente per siero. Pronto per l'uso.
1 x 15 ml	<b>SUBSTRATE TMB</b>	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 15 ml	<b>STOP H2SO4</b>	Soluzione di arresto. Pronta per l'uso.
2 flacone	<b>BUF WASH</b>	Tampone di lavaggio in polvere. <b>Ricostituire a un litro ciascuno.</b>
1 x		Schede del protocollo

#### Componenti facoltativi

1 x 60 ml	<b>BUF WASH</b>	Tampone di lavaggio concentrato liquido. <b>Ricostituire a un litro.</b>
-----------	-----------------	---

#### Simboli utilizzati sulle etichette

	Numero di lotto
	Numero di catalogo
	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



## IT

- 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 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** Si raccomanda di distribuire i campioni in base allo schema seguente.

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

IT

- 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.
- 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** del calibratore pronto 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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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 il calibratore, 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 deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 0,2, altrimenti il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve essere  $<10$  UE/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, calcolare la media di due letture per determinare il valore in UE/ml. La densità ottica del calibratore D deve essere superiore a quella del controllo negativo e inferiore all'assorbanza del controllo positivo. Il controllo positivo deve fornire valori nell'intervallo indicato sul flacone.

### RISULTATI

#### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate utilizzando la seguente formula:

**DETERMINAZIONE QUALITATIVA**

Ass. del campione test

-----

X UE/ml del calibratore = UE/ml del campione test

Ass. del calibratore

Si raccomanda di refertare i risultati qualitativi come "positivi" o "negativi". Risultati del campione superiori o pari a 20 UE/ml sono considerati positivi.

**Calibratore**

Usare per ogni sessione il calibratore pronto per l'uso incluso.

**Interpretazione**

I valori di interpretazione sono stati determinati testando 64 donatori di sangue normali e campioni di controllo senza sindrome da antifosfolipidi. Come cutoff del dosaggio è stata stabilita la media dei soggetti normali più 2,75 DS (deviazione standard) ed è stato assegnato un valore arbitrario di 20 UE/ml. Le informazioni seguenti servono solo come guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i propri valori normali.

<b>Valore ACA</b>	<b>Interpretazione</b>
<20 UE/ml	Negativo
≥20 UE/ml	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.<sup>14,19</sup>

Dosaggi ACA specifici sono necessari per valutare i livelli separati ACA IgA, IgG o IgM anticorpi. 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.<sup>20</sup>

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

Il dosaggio ImmuLISA™ ACA Screen ELISA 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 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.<sup>17</sup>

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

IT

## VALORI PREVISTI

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

Incidenza di ACA in SLE <sup>15, 18-19, 21-24</sup>

Isotipo dell'anticorpo	SLE % incidenza	APS % incidenza
IgG	39-44	36-80
IgA	17-57	10-30
IgM	5-33	15-60
Ogni isotipo	53	71

Associazione malattia di ACA <sup>22, 25-29</sup>

Condizione	Incidenza %
Trombosi venose ricorrenti	28-71
Perdite fetali ricorrenti	28-64
Mielite trasversa	50
Anemia emolitica	38
Trombocitopenia	27-33
Occlusione arteriose	25-31
Livedo Reticularis	25
Ipertensione polmonare	20-40

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

Categoria	n	pos	%
APS con stato sconosciuto ACA	90	56	62.2%
APS con coinvolgimento di SLE e stato sconosciuto ACA	66	60	90.9%
Sieri sottoposti alle prove di APS	185	38	20.5%
SLE	74	24	32.4%
Sieri inviati per la verifica SLE	88	16	18.2%
Trombocitopenia	15	2	13.3%
Pre-eclampsia	15	3	20.0%
Altri aiuti *	192	14	7.3%
NHS	158	3	1.9%

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

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

L'utilità del Immulisa Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM anticorpi ELISA è stata valutata analizzando campioni ben caratterizzati da cardiolipina positivi soggetti SLE accanto ai controlli di malattia. Questi campioni sono stati testati anche su kit ELISA commercialmente disponibili per ogni isotipo. Solo campioni nella gamma lineare dell'analisi sono stati inclusi nel confronto Metodo. Questi risultati sono di seguito riassunte.

A. Immulisa Enhanced™ ACA IgA/IgG/IgM anticorpi ELISA vs altri ACA schermo ELISA:

IT

### Altri Screen ACA ELISA

		Positivo	Negativo	Totale
<b>IMMCO</b>	Positivo	243	27	270
<b>ACA</b>	Negativo	36	299	335
<b>Schermo ELISA</b>	Totale	279	326	605

Positivo accordo per cento: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Accordo percentuale negativa: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Nel complesso accordo per cento: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Malattia associati soggetti (SLE, APS, APS con SLE, sospetta APS e SLE): n=469  
Controlli di malattia: n=136

B. Cross reattività: Un set di campioni potenzialmente interferenti da persone con altre malattie autoimmuni e infezione conosciuta a cross-reagiscono con cardiopina sono stati testati per ACA utilizzando l'ACA schermo ELISA.

Condizione	n		
	Testato	n Pos	% Pos
Malattia celiaca	18	0	0,0%
Malattia mista del tessuto	15	1	6,7%
Miosite	2	0	0,0%
Artrite reumatoide	85	9	10,6%
Sindrome di Sjögren	20	2	10,0%
Sifilide	40	39	97,5%
Sclerosi sistemica	36	2	5,6%
Tiroidite	8	0	0,0%
Vasculite	8	0	0,0%

### Riproducibilità

14 analisi dei campioni in basso gamma negativa, positiva per ACA nella gamma positiva moderata, nei pressi di cutoff e circa + /-20% del dosaggio di taglio sono state eseguite per determinare la riproducibilità qualitativa. Risultati di dosaggio per i negativo, + 20% e moderata campioni positivi prodotti qualitativi accordo 100%. Analisi risultati per il-circa 20% esemplare prodotto qualitativo accordo 97%. Risultati di dosaggio per il campione di taglio vicino prodotto qualitativo accordo 79%.

### 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) determinato per gli anticorpi anti-ACA è stato di 5,2 UE/ml.

### Interferenza

L'interferenza è stata studiata mescolando sieri con livelli noti di ACA 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 reumatoid (100UE/ml), trigliceridi (37 mmol/l) e colesterolo (13 mmol/l).

ImmULisa Enhanced™

# Cardiolipin IgA/IgG/IgM Antibody (ACA) ELISA

Rastreio ELISA Anticorpos Cardiolipina/Fosfolípides

**IVD** Para uso diagnóstico in vitro

## FOLHETO DO PRODUTO

**REF** 5118S    ACA Screen ELISA    96 Determinações

## ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO

Uma enzima ligada imunoensaio (ELISA) para detecção qualitativa de anticorpos cardiolipina IgA, IgG e IgM no soro humano, para auxiliar no diagnóstico da síndrome de anti-fosfolípido (APS) e APS associados com Lúpus eritematoso sistémico (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 antifosfolípides são um grupo heterogéneo dos auto-anticorpos contra os fosfolípideos carregados negativamente.<sup>1</sup> 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 pode ser por vezes necessário para identificar anticorpos antifosfolípides. O formato do ensaio ELISA constitui um método altamente sensível para a detecção de anticorpos antifosfolípides.<sup>2</sup>

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.<sup>1-12</sup> Este ocorre mais comumente em pacientes com lúpus eritematoso sistémico (LES), ou com doenças semelhantes ao lúpus, em que os critérios para o LES não são preenchidos.<sup>5-7</sup> Existe a presença de níveis elevados de anticorpos anti-cardiolipina na trombose, perda fetal, trombocitopenia e em diversos outros distúrbios.<sup>1-15</sup> Foram encontrados níveis reduzidos de anticorpos anti-cardiolipina numa série de distúrbios clínicos, não relacionados com o 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.<sup>5,10</sup> Podem ser identificados níveis baixos de anticorpos IgM noutras doenças auto-imunes, como a artrite

PT

reumatóide, o Síndrome de Sjögren primária, o lúpus eritematoso induzido por drogas, a doença de Lyme e a Sífilis.<sup>8,10</sup>

## PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Antígeno cardiolipina como B2GP1 bem como bovina e humana é ligado aos poços de uma placa de poliestireno micropoços seguido de bloqueio os sites reagidos para reduzir a ligação não-específica. Controles, Calibrador e diluído é adicionados aos diferentes, permitindo que qualquer cardiolipina anticorpos presentes se liguem ao antígeno imobilizado. Amostra não ligado é lavada e uma enzima chamada conjugado IgA/IgG/IgM é adicionado a cada poço. Estes anticorpos enzima conjugada ligam especificamente a imunoglobulina humana da classe apropriada. Após a lavagem para retirar qualquer conjugado não ligado, substrato específico (TMB) é então adicionado ao poços. Depois de parar a reação enzimática, a intensidade da mudança de cor, que é proporcional à concentração de anticorpos, é lido por um espectrofotômetro a 450 nm. Resultados são expressos em unidades de ELISA por mililitro (UE/ml).

## 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.<sup>16</sup>

A solução de paragem é uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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 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.

PT

## Material fornecido

ImmLisa™ ACA Screen ELISA

**REF** 5118S






O kit contém reagentes suficientes para realizar 96 determinações.

<b>12 x 8</b>	<b>MICROPLATE ACA</b>	Microplaca com micropoços separatistas individuais. Revestido com antígeno cardioplipina e bovinos humanos B2GP1. Pronta para uso.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CONTROL+ ACASCREEN</b>	<b>Controlo Positivo</b> (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para ACA. A faixa de concentração esperada em UE/ml está impressa na etiqueta.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CONTROL-</b>	<b>Controlo Negativo</b> pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
<b>1 x 1.75 ml</b>	<b>CALIBRATOR ACASCREEN</b>	Calibrador (tampa verde) pronto a utilizar 30 UE/ml. Derivado do soro humano contendo ACA.
<b>1 x 15 ml</b>	<b>IgA/G/M-CONJ HRP</b>	Conjugado HRP de cabra IgA/IgG/IgM anti-humano. Pronto a utilizar, Código de cor rosa.
<b>1 x 60 ml</b>	<b>DIL</b>	Diluyente de Soro. Pronto a utilizar.
<b>1 x 15 ml</b>	<b>SUBSTRATE TMB</b>	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar, <b>Proteger da luz.</b>
<b>1 x 15 ml</b>	<b>STOP H2SO4</b>	Solução de Paragem. Pronta a utilizar,
<b>2 ampolas</b>	<b>BUF WASH</b>	Tampão de Lavagem de Pó. <b>Reconstituir para um litro cada.</b>
<b>1 x</b>		Folhas de Protocolo.

## Componentes Opcionais

<b>1 x 60ml</b>	<b>BUF WASH</b>	Tampão de Lavagem líquido concentrado. <b>Reconstituir para um litro.</b>
-----------------	-----------------	---

## Símbolos utilizados nas etiquetas

<b>LOT</b>	Número de lote
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>IVD</b>	Para utilização diagnóstica in vitro
	Utilizado 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

## RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só deverão ser utilizados 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 2°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.

PT

**3º Passo** Recomenda-se que as amostras sejam distribuídas de acordo com a tabela seguinte.

A	Branco	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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** ( $\pm 5$  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 deve possuir uma leitura de absorvância não inferior a 0.2; caso contrário, o teste deve ser repetido. O controlo

## PT

negativo deve ser <10 UE/ml. Se o teste for realizado em duplicado, deve ser retirada a média das duas leituras, a fim de determinar UE/ml. A densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. O controlo positivo deve apresentar valores na faixa indicada na ampola.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras dos pacientes podem ser determinadas através da seguinte fórmula:

### DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

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

Recomenda-se que os resultados qualitativos sejam comunicados como “positivos” ou “negativos”. Amostras com resultados superiores ou iguais a 20 UE/ml são consideradas positivas.

### Calibrador

O Calibrador Pronto a Utilizar incluído deve ser utilizado em cada teste.

### Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando 64 dadores de sangue normal e amostras de controlo da doença síndrome não-antifosfolípide. A média dos indivíduos normais mais 2.75 SD foi estabelecida como o corte do ensaio, tendo sido atribuído um valor arbitrário de 20 UE/ml. O seguinte serve apenas como orientação para a interpretação dos resultados laboratoriais. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

<u>Valor ACA</u>	<u>Interpretação</u>
<20 UE/ml	Negativo
≥20 UE/ml	Positivo

A literatura sugere que os níveis reduzidos de anticorpos positivos anti-cardiolipina possam ocorrer 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<sup>14,19</sup>. Isotipo específico ACA ensaios são necessários para avaliar os níveis de anticorpos ACA IgA, IgG ou IgM separados. 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.<sup>20</sup>

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ImmuLisa™ ACA Screen ELISA não deve ser realizado sobre amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipémicas. Este método só deve ser utilizado para testar amostras de soro humano.

Recomenda-se fortemente a realização de testes para os três isotipos de ACA. A realização de testes a apenas um e não à totalidade dos isotipos 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

## PT

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.<sup>17</sup>

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

## VALORES ESPERADOS

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

Incidência de ACA em SLE<sup>15, 18-19, 21-24</sup>

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 doença de ACA<sup>22, 25-29</sup>

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 Screen ELISA. Os resultados que demonstram a incidência deste estudo na população são seguidamente apresentados.

Categoria	n	pos	%
APS com status desconhecido ACA	90	56	62.2%
APS com envolvimento de SLE e status desconhecido ACA	66	60	90.9%
Sera submetido ao teste de APS	185	38	20.5%
SLE	74	24	32.4%
Sera submetido ao teste de SLE	88	16	18.2%
Trombocitopenia	15	2	13.3%
Pre-eclampsia	15	3	20.0%
Outros auxílios *	192	14	7.3%
NHS	158	3	1.9%

\* Outras doenças auto-imunes incluem a doença celíaca, miosite, artrite reumatóide, esclerodermia, tireoidite e Vasculite

PT

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O utilitário avançado ImmuLISA™ ACA IgA/IgG/IgM anticorpos ELISA foi avaliado pelo teste das amostras de cardioplipina positivos temas de SLE juntamente com controles de doença. Estas amostras foram testadas também disponíveis comercialmente kits ELISA para cada isotipo. A comparação do método foram incluídas apenas amostras no intervalo linear do ensaio. Estes resultados são resumidos a seguir.

A. Enhanced ImmuLISA™ ACA IgA/IgG/IgM anticorpos ELISA vs outros ACA ELISA de tela:

		Altri Screen ACA ELISA		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	243	27	270
ACA	Negativo	36	299	335
Schermo ELISA	Totale	279	326	605

Positivo accordo per cento: 87,1% (95% CI 80,5% - 90,7%)

Accordo percentuale negativa: 91,7% (95% CI 88,0% - 94,4%)

Nel complesso accordo per cento: 89,6% (95% CI 86,8% - 91,9%)

Malattia associati soggetti (SLE, APS, APS con SLE, sospetta APS e SLE):n=469

Controlli di malattia: n=136

B. Cruz reatividade: Um conjunto de amostras potencialmente cross-reactive de indivíduos com outras doenças auto-imunes e infecção conhecida a reação cruzada com cardioplipina foram testados para ACA usando o ACA Screen ELISA.

Condição	n testado	Pos n	Pos %
Doença celíaca	18	0	0.0%
Doença mista do tecido	15	1	6.7%
Miosite	2	0	0.0%
Artrite reumatóide	85	9	10.6%
A síndrome de Sjögren	20	2	10.0%
Sífilis	40	39	97.5%
Esclerose sistêmica	36	2	5.6%
Tireoidite	8	0	0.0%
Vasculite	8	0	0.0%

### Reprodutibilidade

14 ensaios de amostras no intervalo baixo negativo, positivo para ACA na faixa positiva moderada, perto do corte e aproximadamente +/-20% do ensaio corte foram realizados para determinar a reprodutibilidade qualitativa. Resultados do ensaio para os negativo, +20% e moderada amostras positivas produziram 100% de concordância qualitativa. Resultados do ensaio a aproximadamente -20% amostra produzido acordo qualitativa de 97%. Resultados do ensaio para o próximo corte espécime produziram acordo qualitativa de 79%.

### 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 5.2 UE/ml.

PT

### **Interferência**

A interferência foi estudada, através da mistura do soro com os níveis conhecidos de ACA 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  $\mu\text{mol/L}$ ), Factor Reumatóide (100 UE/ml), Triglicéridos (37 mmol/L) e Colesterol (13 mmol/L).

## 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 RHW 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. *Arth Rheum 56th Annual Meeting.* 1992. S125.
16. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
17. Levy RA et al. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis. *J Rheumatol.* 1990. 17:1036-1041.
18. 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.
19. Ebrahim RA et al. Antiphospholipid syndrome among Bahraini patients. *Saudi Med J.* 2005. 26:488-90.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Gharavi AE et al. Antiphospholipid antibody tests. *Manual of clinical laboratory immunology sixth edition.* Rose NR et al (ed). 2002. 973-980.
25. 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.
26. Asherson RA et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine.* 1989. 68:366-374.
27. Asherson RA et al. Anticardiolipin antibodies-clinical associations. *Post Med J.* 1986. 62, 1081-1087.
28. Gezer S. Antiphospholipid Syndrome. *Dis Mon.* 2003. 49: 691-742.
29. Bick RL. Antiphospholipid Thrombosis Syndromes. *Clin Appl Thromb/Hemosta.* 1997. 7; 4: 241-258.





*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](mailto: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](http://www.emergogroup.com)

NOV2012  
Document No. PI5118S