



# ImmuLisa™ Anti-Cardiolipin Antibody (ACA) Screen ELISA

For *in vitro* Diagnostic Use



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

## PRODUCT INSERT

Catalog No. 1118S

**ACA Screen**

96 Determinations

## INTENDED USE

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

## SUMMARY AND EXPLANATION

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous group of autoantibodies against negatively charged 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.

Of the various tests for the detection of antiphospholipid antibodies, the anti-cardiolipin antibody test performed by ELISA is the most sensitive<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>.

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

## PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

Cardiolipin antigen is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrator and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any cardiolipin antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifi-

cally to the human immunoglobulin of the appropriate class. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

**REAGENTS**

**Storage and Preparation**

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

**Precautions**

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>17</sup>. **WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO DIAGNOSTICS.

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

**Materials provided**

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA REF 1118S

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE ACA	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with cardiolipin antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR ACA *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to cardiolipin.
1 x 1.5 ml	CONTROL + ACA *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for ACA.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	CONJ ALKPHOS *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
2 x 60 ml	DIL *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.

1 x 12 ml **SUBSTRATE**\*

Ready to use **Enzyme Substrate**.  
Contains pNPP. **Protect from light.**

1 x 12 ml **STOP**

Ready to use **Stop Solution**.

2 **BUF WASH**

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

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materials Required But Not Provided

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

### PROCEDURE

#### Procedural Notes

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

#### Assay procedure

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

## QUALITATIVE DETERMINATION

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

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

### Quality Control

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

### RESULTS

#### Calculations

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

## QUALITATIVE DETERMINATION

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

### Interpretation

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

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

The literature suggests that, low positive anti-cardiolipin antibody levels may occur in a variety of clinical disorders unrelated to antiphospholipid antibody syndrome. Hence according to the investigators recommendations the diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome should be made only when the test results are moderately or highly positive<sup>14</sup>.

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

### EXPECTED VALUES

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

#### *Incidence of ACA in SLE*<sup>15,18</sup>

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

#### *Disease Association of ACA*

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

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Comparison of ELISA Methods for the Detection of ACA

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

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%

relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 100.0%

relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Precision:

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

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Recovery:

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

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recuperação
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2



# Immuli<sup>TM</sup> Anti-Cardiolipina Anticuerpos Screen (ACA) ELISA

IVD

REF

1118S

ACA Screen

96 Determinaciones

Immuli<sup>TM</sup> ACA ELISA es un ensayo basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección de anticuerpos IgA, IgG y IgM anticardiolipina. Los anticuerpos anticardiolipina se utilizan como ayuda para ayudar en la evaluación del riesgo de trombosis en pacientes con el síndrome del antiphospholipide.

## Sumario y Explicación de la prueba

Los anticuerpos antiphospholipides son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos contra los phospholipides negativamente cargados <sup>1</sup>. Son detectados sobre todo por la prueba del anticuerpo del anti-cardiolipina (ACA), la prueba positiva falsa biológica para la sífilis y la prueba del anticoagulante del lúpico. Estas tres pruebas detectaron los anticuerpos relacionados, pero no necesariamente idénticos. Así, más de uno de estas pruebas es a veces necesario identificar los anticuerpos del antiphospholipide.

De las varias pruebas para la detección de los anticuerpos del antiphospholipide, la prueba del anticuerpo del anti-cardiolipina realizada por ELISA es los 2 más sensibles. La presencia de las ayudas de los anticuerpos del anti-cardiolipina para identificar a pacientes en el riesgo de la trombosis venosa y/o arterial acompañada a menudo por el thrombocytopenia, un síndrome designado el síndrome del antiphospholipide <sup>1-12</sup>. El síndrome del antiphospholipide ocurre lo más comúnmente posible en pacientes con LES o lúpico-como la enfermedad donde los criterios para LES no se satisfacen <sup>5-7</sup>. Los altos niveles de los anticuerpos del anti-cardiolipina ocurren en la trombosis, la pérdida fetal, el thrombocytopenia y varios otros desórdenes <sup>1-15</sup>. Los niveles bajos de los anticuerpos del anti-cardiolipina se encuentran en una variedad de desórdenes clínicos que estén sin relación al síndrome del antiphospholipide. Por lo tanto, los niveles bajos de estos anticuerpos están de significación limitada.

Los anticuerpos del anti-cardiolipina de la clase IgG y de IgA aparecen ser asociados más de cerca a síndrome del antiphospholipide que los anticuerpos de la clase IgM. Sin embargo, los anticuerpos de IgM aparecen ser influenciados más por el tratamiento <sup>5,10</sup>. Los niveles bajos de los anticuerpos de IgM se pueden identificar en otras enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, síndrome de Sjögren primario, lupus eritematoso inducidos droga, enfermedad de Lyme, y sífilis <sup>8,10</sup>.

## PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

Los pocillos de la microplaca contienen antígeno cardiolipina. La microplaca se bloquea para reducir reacciones no específicas. Se añaden controles, calibradore y muestras diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los anticuerpos anti cardiolipina al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti-humana a cada pocillo. Este la enzima conjugó los anticuerpos ata específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase apropiada. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se agrega el sustrato enzimático específico (pNPP). Tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. Se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra la cardiolipina por medio de la comparación de la densidad óptica de la muestra. Los resultados se dan a conocer de forma cualitativa en unidades ELISA/mililitre (EU/ml).

## REACTIVOS

### Condiciones de Almacenaje

Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente. No utilizar si el reactivo no está claro.

Tampón de lavado: Agregar el agua destilada o desionizada para el volumen del 1L.

Micropocillos: Utilizar una vez solamente.

### Precauciones

Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HbsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los reactivos deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso.

Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.

La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.

Utilizar las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química.

No utilizar después de fecha de vencimiento.

### Materiales Suministrados

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA

REF

1118S

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 96 determinaciones.

12 x 8

MICROPLATE ACA

Microplaca con los micropocillos disidentes individuales cubrió con el antígeno del cardioliipina.

1 x 1.5 ml

CALIBRATOR ACA \*

Calibrador (*casquillo verde*), listo para uso. Contiene suero humano.

1 x 12 ml

CONJ ALKPHOS \*

conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.

2 x 60 ml

DIL \*

tampón de dilución para muestras. Azul cifrado color.

1 x 12 ml

SUBSTRATE \*

substrato enzimático. Contiene el pNPP. **Proteger contra luz.**

1 x 12 ml

STOP

solución de parada

2

BUF WASH

tampón de lavado para 1 litro/vial

\* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Material necesario no incluido

Micropipetas para 5 - 1000µl

Puntas desechables para micropipeta

Tubos para dilución de muestras, 4ml

Agua destilada

Lector de microplacas capaz de medir densidades ópticas a 405nm

Botella para tampón de lavado

Contador de tiempo

Papel absorbente

### Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Evitar congelar repetido y deshelar.

### PROCEDIMIENTO

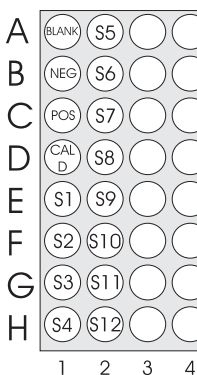
#### Notas Procesales

- Antes comenzando con el análisis leer cuidadosamente el relleno del producto.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivo de la prueba equilibrar en la temperatura ambiente antes comenzando con el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al refrigerador inmediatamente después del uso.
- Todas las diluciones de las muestras pacientes se deben preparar antes comenzando con del análisis.
- Quitar requirió tiras del micropocillos de la bolsa y resellan cuidadosamente la bolsa para prevenir la condensación en los pozos inusitados. Volver la bolsa inmediatamente al refrigerador.
- *Lavado: La buena técnica es crítica. **Se recomienda una arandela automatizada del microplaca.***
- Utilizar una pipeta de varios canales capaz de entregar 8 pozos simultáneamente. Esto apresura el proceso y preve por un más tiempo uniforme de la incubación.
- Para todos los pasos, el control cuidadoso de la sincronización es importante. El comienzo de todos los períodos de la incubación comienza con la terminación de la adición el reactivo.

#### Metodología

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente.
2. Indicar la colocación del espécimen en la página del protocolo. Es buena práctica del laboratorio funcionar muestras en duplicado.
3. Preparar una dilución 1:201 de cada muestra a procesar añadiendo 5 µl de muestra a 1.0 ml de tampón de dilución para muestras.
4. Quite los microwells requeridos de bolsa y vuelva las tiras inusitadas en la bolsa sellada al refrigerador. Ponga con seguridad los microwells en el sostenedor proporcionado suplemento.
5. Agregar 100 µl de los controles, de calibradores, de y las muestras pacientes diluidas a los micropocillos apropiados según protocolo cubre.

**Nota:** Incluir un pozo que contenga **100 µl** del tampón de dilución para muestras como espacio en blanco el reactivo. Poner a cero a lector de ELISA contra el espacio en blanco el reactivo.



6. Incubar **30 minutos** ( $\pm 5$  minutos) en la temperatura ambiente.
7. Lavado (4x): Aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300 $\mu$ l de solución de lavado a todos pocillos y aspirar. Para el lavado manual, llenar cada micropocillos del almacenador intermedio reconstituido de la colada. Desechar el líquido invirtiendo y golpeando ligeramente fuera del contenido de cada uno el pozo o aspirando el líquido de cada uno bien. Para borrar en el extremo de la colada pasada, de las tiras invertidas y golpear ligeramente los pozos vigoroso en las toallas de papel absorbentes. Para las arandelas automáticas, programar la arandela según las instrucciones del fabricante.
8. Agregar 100  $\mu$ l de conjugado en micropocillos.
9. Incubar **30 minutos** ( $\pm 5$  minutos) en la temperatura ambiente.
10. Lavado: Todos los micropocillos como en 7.
11. Agregar 100  $\mu$ l de sustrato enzimático en cada micropocillos en la misma orden y la sincronización que para el conjugado.
12. Incubar **30 minutos** ( $\pm 5$  minutos) en la temperatura ambiente.
13. Agregar 100  $\mu$ l de solución de parada en cada micropocillos usando la misma orden y midiendo el tiempo que para la adición del sustrato enzimático. Leer los valores de la absorbencia en el plazo de 1 hora de agregar solución de parada.
14. Leer la absorbancia (OD) de cada pocillo a 405nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

### Control de calidad

Los calibrador, control positivo y control negativo y un espacio en blanco el reactivo se deben funcionar con cada análisis para verificar la integridad y la exactitud de la prueba. La lectura de la absorbencia del espacio en blanco el reactivo debe ser  $< 0.3$ . El calibrador debe tener una lectura de la absorbencia de no menos que 1.0, si no la prueba debe ser repetida. El control negativo debe ser  $< 20$  EU/ml. Si la prueba se funciona en duplicado, el medio de las dos lecturas se debe tomar para EU/ml de determinación. Mientras que realiza las determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador debe ser mayor que la del control negativo y de menos que la absorbencia del control positivo.

### RESULTADOS

#### Cálculo de Resultados

El método siguiente se debe utilizar para determinar los resultados positivos o negativos para ACA.

$$\frac{\text{OD Espécimen}}{\text{OD Calibradore}} \times \text{EU/ml de Calibradore} = \text{EU/ml Espécimen}$$

## Interpretación

La información siguiente sirve solamente como guía en la interpretación de los resultados del laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

La literatura sugiere que los niveles bajos del positivo ACA puedan ocurrir en las enfermedades no relacionadas con el síndrome del anticuerpo antiphospholipid. Los investigadores recomiendan una diagnosis del síndrome del anticuerpo antiphospholipid solamente cuando los resultados de la prueba son moderado o altamente positivos<sup>14</sup>.

## Limitaciones del Procedimiento

No se puede realizar un diagnóstico tomando como base sólo los resultados de ACA. Éstos se deben interpretar junto con los hallazgos físicos.

Cuando se detectan títulos negativos de ACA en presencia de indicaciones clínicas, se demuestra la necesidad de un anticoagulante lúpico u otra prueba adicional. Un alto porcentaje de pacientes con sífilis activa confirmada o seropositiva tiene niveles altos de ACA. Por lo tanto se deben emprender procedimientos de confirmación a fin de descartar la sífilis.

## Valores Esperados

La incidencia de ACA en varias condiciones de la enfermedad se resume abajo:

### *Incidencia de ACA en SLE<sup>15,18</sup>*

Anticorpos Isotipo	% Incidencia
IgG	39-44
IgA	17-57
IgM	5-33
Todos isotipos	53

### *Disease Association of ACA*

Condición	% Incidencia
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

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

### Comparación de ELISA de ACA

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

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%  
relative sensitivity/sensibilit  relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivit t/sensibilit  relativa/sensibilidade relativa: 100.0%  
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative  bereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Precisión:

Dos muestras con concentraciones sabidas de ACA fueron probadas en 10 réplicas durante dos semanas. Intra- y inter-placa coeficiente del variación (CV) era como sigue:

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Recuperación

Los especímenes con concentraciones sabidas de ACA fueron mezclados con otro espec men del positivo de ACA. Los valores de ACA de los especímenes mezclados fueron determinados y la recuperación era calculada.

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recupera�o
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2



# ImmuLisa™ Anti-Cardiolipine Anticorps (ACA) Screen ELISA

IVD

REF 1118S ACA Screen 96 déterminations

ImmuLisa™ ACA ELISA est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection des anticorps IgA, IgG e IgM contre cardiolipine dans le sérum humain. La présence d'anticorps anti-cardiolipine peut être utilisée afin d'aider à évaluer le risque d'une thrombose chez les personnes atteintes de syndrome d'anti-phospholipide.

## GENERALITES

Les anticorps antiphospholipides sont un groupe hétérogène d'autoanticorps contre les phospholipides négativement chargés<sup>1</sup>. Ils sont détectés principalement par l'essai de l'anticorps anti-cardiolipine (ACA), l'essai faussement positif biologique pour le syphilis et l'essai anticoagulant lupique. Ces trois essais détectent les anticorps connexes, mais pas nécessairement identiques. Ainsi, plus d'un de ces essais est parfois nécessaire pour identifier des anticorps antiphospholipides.

Des divers essais pour la détection des anticorps antiphospholipides, l'essai d'anticorps anti-cardiolipine réalisé par ELISA est les plus sensibles<sup>2</sup>. La présence des anticorps ACA aide identifier des patients en danger de la thrombose artérielle et veineuse souvent accompagnée de la thrombocytopenie, ou "le syndrome antiphospholipide"<sup>1-12</sup>. Le syndrome antiphospholipide se produit le plus généralement dans les patients avec le lupus érythémateux disséminé (SLE) ou les troubles ressemblant au lupus où les critères pour SLE ne sont pas accomplis<sup>5-7</sup>. Les niveaux élevés des anticorps anti-cardiolipine se produisent dans la thrombose, la perte foetale, la thrombocytopenie et plusieurs autres désordres<sup>1-15</sup>. Des niveaux bas des anticorps anti-cardiolipine sont trouvés dans une variété de désordres cliniques qui sont indépendants du syndrome antiphospholipide. Par conséquent, les niveaux bas de ces anticorps sont d'importance limitée.

Des anticorps anti-cardiolipine de classe IgG et de classe IgA semblent être associés plus étroitement au syndrome antiphospholipide que les anticorps de classe IgM. Cependant, des anticorps IgM semblent être influencés davantage par le traitement<sup>5,10</sup>. Des niveaux bas des anticorps IgM peuvent être identifiés dans d'autres maladies autoimmunes telles que l'arthrites rhumatoïdes, le Syndrome de Sjögren primaire, le lupus érythémateux, la maladie de Lyme, et le syphilis induits par drogue<sup>8,10</sup>.

## PRINCIPE DU TEST

L'antigène cardiolipine est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène. La plaque est bloqué pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, l'étalon et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-cardiolipine présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Ces anticorps lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe appropriée. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps anti-cardiolipine sera déterminée en comparant la densité optique de l'échantillon à celle. Les

résultats sont enregistrés en unités ELISA / millilitre (EU/ml).

## CONTENU DU COFFRET

### Conditions de conservation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.

N'employez pas si le réactif n'est pas clair.

Tampon de lavage: Ajoutez l'eau distillée ou désionisée pour le volume de 1L.

Micropuits: Employez une fois seulement.

### Précautions

Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.

L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) est utilisé comme conservateur.  $\text{NaN}_3$  est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.

Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.

Employez les bonnes techniques de laboratoire pour réduire au minimum la contamination microbienne et chimique.

**N'employez pas après date d'échéance.**

### Matériel fourni

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA

**REF** 1118S

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 déterminations chacune.

12 x 8	<b>MICROPLATE ACA</b>	barettes de 96 micropuits individuels, revêtue d'antigène cardiopiline
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR ACA</b> *	étalon (chapeau vert), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ACA</b> *	contrôle positif (chapeau rouge), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	contrôle négatif (chapeau blanc), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> *	conjugué phos. alc. Rose codé par couleur.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluant pour échantillons. Bleu codé par couleur.

1 x 12 ml **SUBSTRATE** \*

substrat enzymatique. Contient le pNPP.  
**Protéger contre la lumière.**

1 x 12 ml **STOP**

solution d'arrêt

2 **BUF WASH**

tampon de lavage pour 1 litre/flacon

\* Contient < 0.1%  $\text{NaN}_3$

### Autre matériel nécessaire non fourni

Pipettes pour 5- 1000  $\mu\text{l}$

Cônes jetables

Tubes de 4ml pour la dilution de sérum

Eau distillée ou déionisée

Lecteur ELISA avec filtre de 405nm

Bouteille pour le tampon de lavage

Temporisateur

Papier absorbant

### Echantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Évitez la congélation répétée et le dégel.

### MÉTHODE

#### Préparation du test

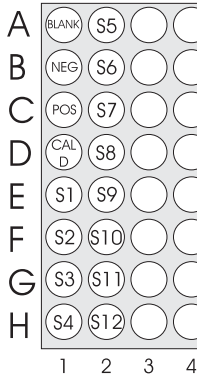
- Avant de commencer l'analyse a lu ces instructions soigneusement.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Matériaux de retour au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer l'essai.
- **Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.**
- Lavage: La bonne technique est critique. Une rondelle automatisée de plaque microtitration ELISA est recommandée.
- Utiliser une pipette multicanale capable de fournir 8 positions simultanément. Ceci expédie le processus et prévoit un temps plus uniforme d'incubation.
- La synchronisation soigneuse est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution du réactifs.

#### Exécution du test

1. **PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE LES UTILISER.**
2. Employer le page de protocole pour noter la position des spécimens dans la plaque microtitration. Il est dans de bons habitudes de laboratoire d'examiner des spécimens deux fois.
3. Préparez une dilution de **1:201** du spécimen patient en mélangeant **5  $\mu\text{l}$**  du spécimen patient à **1.0 ml** de diluant pour échantillons.

- Enlevez les microwells requis de la poche et renvoyez les bandes inutilisées dans la poche scellée au réfrigérateur. Placez solidement les microwells dans le support fourni par frais supplémentaires.
- Distribuer 100 µl des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits.

**Note :** Incluez une position avec **100 µl** du diluant pour échantillons comme blanc de réactif. La valeur nulle du lecteur de plaque microtitration devrait être placée en utilisant cette position. L'absorbance de ce micropuit ne devrait pas être 0.3 plus grand que.



- Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300µl de tampon dans tous les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne séchez pas les puits complètement.
- Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
- Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
- Distribuer 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puits
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
- Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
- Lire la densité optique (D.O.) de chaque puits à 405nm en utilisant un lecteur simple ou duel de plaque microtitration de longueur d'onde contre l'ensemble blanc de réactif à l'absorbance nulle.

### Contrôle de qualité

L'étalon, le contrôle positif et le contrôle négatif et un blanc doivent être courus avec chaque analyse pour vérifier l'intégrité et l'exactitude de l'essai. La lecture d'absorbance du blanc devrait être < 0.3. L'étalon devrait avoir un DO pas moins de de 1.0, autrement l'essai doit être répété. La contrôle négative doit être < 20 EU/ml. Si l'essai est exécuté deux fois, le moyen des deux lectures devrait être pris pour détermination de EU/ml. Tout en effectuant des déterminations qualitative, le DO d' étalon doit être plus grand que le contrôle négatif et de moins que l' DO du contrôle positif.

### RÉSULTATS

#### Calcul des résultats

La méthode suivante devrait être employée pour déterminer des résultats positifs ou négatifs pour ACA.

$$\frac{\text{D.O. de Spécimen}}{\text{D.O. de Étalon}} \times \text{EU/ml de étalon} = \text{EU/ml de Spécimen}$$

### Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

La littérature suggère cela, les niveaux positifs bas d'anticorps anti-cardiolipine peut se produire dans une variété de désordres cliniques indépendants du syndrome d'anticorps antiphospholipide. Par conséquent conformément aux recommandations d'investigateurs le diagnostic du syndrome d'anticorps antiphospholipide devrait être fait seulement quand les résultats d'essai sont modérément ou fortement le positif <sup>14</sup>.

### Limites du test

Un diagnostic ne peut être établi uniquement sur la base des résultats ACA. Ces résultats doivent être interprétés conjointement avec les données physiques.

Lorsque des titrages d'ACA négatifs sont visibles en présence d'indications cliniques, un anticoagulant lupique ou d'autres tests supplémentaires sont indiqués. Un pourcentage élevé de patients atteints de syphilis active ou séropositive auront des niveaux d'ACA élevés. Des procédures de confirmation doivent être effectuées afin d'éliminer la syphilis.

### VALEURS ATTENDUES

L'incidence d'ACA en divers états de la maladie est récapitulée ci-dessous :

#### *Incidence d'ACA dans SLE <sup>15,18</sup>*

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

## Association d'ACA

### Condition

### % Incidence

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

## PERFORMANCES

### Comparaison d'ELISA ACA

		IMMCO ACA Screen		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immuli <sup>TM</sup>	POS (+)	31	0	31
ACA IgG/A/M	NEG (-)	2	42	44
	TOT (=)	33	42	75

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%  
relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 100.0%  
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Précision :

On a analysé deux échantillons avec des concentrations connues d'ACA dans 10 répliques pendant deux semaines. Les intra- et inter-plaques coefficients de variations (CV) étaient comme suit :

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Rétablissement

Des spécimens avec des concentrations connues d'ACA ont été mélangés à un autre spécimen positif d'ACA. Les valeurs d'ACA des spécimens mélangés ont été déterminées et le rétablissement a été calculé.

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenuto/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recuperação
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2



# ImmuLisa™ Anticardiolipin-Antikörper (ACA) Screen ELISA

IVD

REF 1118S ACA Screen 96 Ermittlungen

ImmuLisa™ ACA ELISA ist ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für Bestimmung von IgG, IgA und IgM Antikörpern gegen Cardiolipin im Humanserum. Diese Gegenwart von Cardiolipin-Antikörpern kann um die Beurteilung des Thromboserisikos in Patienten mit das Anti-Phospholipid Syndrom.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antiphospholipiden Antikörper sind eine heterogene Gruppe Autoantikörper gegen negativ belastete Phospholipide<sup>1</sup>. Sie werden hauptsächlich durch den Test des Anticardiolipin-Antikörper (ACA), den biologischen falschen positiven Test für Syphilis und den Lupus-Antikoagulans- Test ermittelt. Diese drei Tests ermitteln die in Verbindung stehenden, aber nicht notwendigerweise identischen Antikörper. So ist mehr als eins dieser Tests manchmal notwendig, um Antiphospholipiden-Antikörper zu kennzeichnen.

Der verschiedenen Tests für die Abfragung der Antiphospholipiden-Antikörper, ist der Anticardiolipin-Antikörpertest, der von ELISA durchgeführt wird, die empfindlichsten<sup>2</sup>. Das Vorhandensein der Anticardiolipin-Antikörperhilfen, zum der Patienten an der Gefahr des venösen und arteriellen Thrombose zu kennzeichnen häufig begleitet von der Thrombocytopenie, ein Syndrom gekennzeichnet als Antiphospholipiden Syndrom<sup>1-12</sup>. Das Antiphospholipiden Syndrom tritt am allgemeinsten bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) oder Lupus-ähnlichen Erkrankungen auf, in der die Kriterien für SLE nicht erfüllt werden<sup>5-7</sup>. Hohe Niveaus der Anticardiolipin-Antikörper treten in Thrombose, in fötalem Verlust, in Thrombocytopenie und in anderen<sup>1-15</sup>. Niedrige Niveaus der Anticardiolipin-Antikörper werden in einer Vielzahl der klinischen Störungen gefunden, die zum Antiphospholipiden Syndrom ohne Bezug sind. Folglich sind niedrige Niveaus dieser Antikörper von begrenzter Bedeutung.

IgG und IgA Kategorie ACA scheinen, mit Antiphospholipiden Syndrom als die IgM Kategorie Antikörper genauer verbunden zu sein. Jedoch scheinen IgM Antikörper, durch Behandlung mehr beeinflusst zu werden<sup>5,10</sup>. Niedrige Niveaus der IgM Antikörper können in anderen Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoiden Arthritis, Sjögrens Syndrome Primär, Droge verursachtem Lupus erythematodes, Lyme Krankheit und Syphilis gekennzeichnet werden<sup>8,10</sup>.

## TESTPRINZIP

Cardiolipin Antigen wurde an die Einzelvertiefungen der Polystyrol-Mikrotiterplatte. Der ohne Reaktion Aufstellungsorte werden blockiert, um unspezifische Reaktionen zu verringern. Kontrollen, Kalibrator und verdünnte Patientenserum werden in verschiedene Einzelvertiefungen pipettiert. Die vorhandenen Cardiolipin Antikörper binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humane wird in die Einzelvertiefungen pipettiert. Dieses konjugierte Enzym Antikörper binden spezifisch an das menschliche Immunglobulin der passenden Kategorie. Nachdem in einem weiteren Waschschritt das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein spezifisch Substrat (pNPP) zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Nach Anhalten der enzymatischen Reaktion von farbigen Produkten die Intensität der Farbe Änderung zur Konzentration des Antikörpers ist proportional. Die Ergebnisse werden in EU/ml protokolliert.

## INHALT DER TESTPACKUNG

### Lagerung

Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.

Nicht verwenden, wenn Reagens nicht frei ist.

Wäschepuffer: Destilliertes oder entionisiertes Wasser für 1L Volumen hinzufügen.

Einzelvertiefungen: Nur einmal verwenden.

### Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.

NaN<sub>3</sub> wird als Stabilisator verwendet. NaN<sub>3</sub> ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.

Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Gute Labortechniken verwenden, um Mikroben- und chemische Verschmutzung herabzusetzen.

Nicht nach Verfallsdatum verwenden.

### In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA

**REF** 1118S

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 96 Ermittlungen jede durchzuführen.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>ACA</b>	Mikroplatte mit 96 Einzelvertiefungen beschichtet mit Cardioliolin Antigen.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>ACA</b> *	Kalibrator ( <i>grüne Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>ACA</b> *	Positive Kontrolle ( <i>rote Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Negative Kontrolle ( <i>weiße Kappe</i> ), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> *	Alkalische Phosphatase Konjugat. Farbe kodierter Pink.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gepuffertes Probediluent. Farbe kodiertes Blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Enzym Substrat. Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Stopplösung
2	<b>BUF WASH</b>	Waschpuffer für je 1 Liter

\* enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Zusätzliches benötigtes Material

Pipetten für 5 - 1000 µL

Einmal-Pipettenspitzen

Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen

Distilliertes oder deionisiertes Wasser

Reader für Mikrotiterplatten mit 405 nm Filter

Flasche für Wäschepuffer

Timer

Saugfähiges Papier

## Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen vermeiden.

## Methode

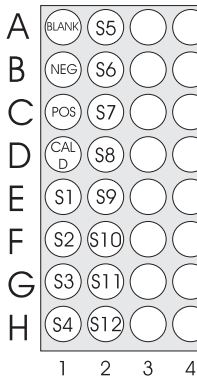
### Testvorbereitung

- Bevor sie begann, las die Probe diese Anweisungen sorgfältig.
- Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) für 30 Minuten. Rückholmaterialien zum Kühlraum sofort nach Gebrauch.
- Alle Verdünnungen der geduldigen Probestücke vorbereiten, bevor Sie den Test beginnen.
- **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
- Waschen: Gute Technik ist kritisch. Eine automatisierte Mikrotiter-ELISA-Platte Unterlegscheibe wird empfohlen.
- Eine Mehrkanalpipette benutzen, die zu 8 Positionen gleichzeitig liefern fähig ist. Dieses beschleunigt den Prozeß und stellt während einer konstanteren Ausbrütungszeit zur Verfügung.
- Zeit sorgfältig überwachen. Ausbrütung- Perioden fangen an, nachdem sie Reagenzien zugeführt haben.

### Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.**
2. Protokollaufzeichnung benutzen, um Position der Probestücke zu merken. Es ist gutes Laborüblich, Probestücke in doppelter Ausführung zu prüfen.
3. Eine **1:201** Verdünnung des geduldigen Probestücks vorbereiten, indem Sie **5 µL** des geduldigen Probestücks mit **1.0 ml** von Gepuffertes Probediluent.
4. Entfernen Sie die erfordernten microwells vom Beutel und bringen Sie unbenutzte Streifen im Siegelbeutel zum Kühlraum zurück. Setzen Sie sicher die microwells in den Extrakosten zur Verfügung gestellten Halter.
5. 100µL von jedem der Kalibratoren, der verdünnten Patientenproben, der Negative Kontrolle und der Positive Kontrolle in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

**Anmerkung:** Eine Position mit **100 µL** Gepuffertes Probediluent als Reagensfreier Raum einschließen. Der nullwert des Mikrotiter-Platte Lesers sollte mit dieser Position eingestellt werden. Die Absorption dieses Einzelvertiefung sollte nicht als 0.3 grösser sein.



6. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Waschen: Den Inhalt aller Einzelvertiefungen absaugen. Die Einzelvertiefungen vollständig (200-300 µL) mit Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch dreimal wiederholen (Insgesamt: vier Waschschrte). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Nicht vollständig trocknen.
8. 100 µL des Konjugates in jede Einzelvertiefung geben.
9. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
10. Waschen: Schritt Nr. 7 wiederholen.
11. 100 µL Enzym Substrat in jede Einzelvertiefung geben.
12. 30 Minuten bei Raum-temperatur inkubieren.
13. 100 µL Stopplösung in jede Einzelvertiefung pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des Enzym Substrat einhalten. Die optische Dichte (OD) innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen.
14. Die optische Dichte (OD) jeder Einzelvertiefung bei 405 nm ablesen mit einem einzelnen oder Doppelwellenlänge Mikrotiter-Platte Leser mit dem Reagensfreier Kavität bei null lesen.

### Qualitätskontrolle

Kalibrator, Positive Kontrolle und Negative Kontrolle und ein freier Raum müssen mit jeder Probe laufen gelassen werden, um die Vollständigkeit und die Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Absorption Messwert des freien Raumes sollte < 0.3 sein. Kalibrator sollte ein OD von nicht weniger als 1.0 haben, andernfalls muß der Test wiederholt werden. Die negative Steuerung muß < 20 EU/ml. Wenn der Test in doppelter Ausführung laufen gelassen wird, sollte das Mittel der zwei Messwerte für feststellenU/ml genommen werden. Beim Durchführen der qualitative Ermittlungen, muß das OD von Kalibrator als das der negativen Steuerung und kleiner als das OD der positiven Steuerung grösser sein.

### ERGEBNISSE

#### Berechnung der Ergebnisse

Die folgende Methode sollte verwendet werden, um die positiven oder negativen Resultate für ACA festzustellen.

$$\frac{\text{OD von Probestück}}{\text{OD von Kalibrator}} \times \text{EU/ml von Kalibrator} = \text{EU/ml von Probestück}$$

## Deutung

Die folgenden Informationen dienen nur als Führer in der Deutung der Laborresultate. Jedes Labor muß seine eigenen normalen Werte feststellen.

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

Die Literatur schlägt vor, daß niedrige Niveaus des Positivs ACA in einer Vielzahl der Störungen auftreten, die nicht auf antiphospholipid Antikörpersyndrom bezogen werden. Forscher empfehlen eine Diagnose des antiphospholipid Antikörpersyndroms, nur wenn Testergebnisse gemäßigt oder in hohem Grade positiv sind <sup>14</sup>.

### Grenzen des Verfahrens

Die Diagnose kann nicht allein auf Basis der ACA-Ergebnisse erstellt werden. Diese Ergebnisse müssen in Verbindung mit den physikalischen Befunden interpretiert werden. Wenn negative ACA-Titer in Gegenwart klinischer Indikationen gefunden werden, ist ein Lupus-Antikoagulans- oder anderer zusätzlicher Test indiziert.

Eine hohe Prozentzahl von Patienten mit bestätigter aktiver oder seropositiver Syphilis weist erhöhte ACA-Werte auf. Zum Ausschluss von Syphilis sollten bestätigende Nachweisverfahren durchgeführt werden. ACA kann kurzzeitig bei vielen Infektionen auftreten. ACA-positive Patienten sollten nach angemessener Wartezeit erneut getestet werden.

### ERWARTETE WERTE

Die Ausdehnung von ACA in verschiedenen Krankheitszuständen wird unten zusammengefaßt:

#### **Ausdehnung von ACA in SLE <sup>15,16</sup>**

Antikörper Isotype	% Ausdehnung
IgG	39-44
IgA	17-57
IgM	5-33
Any isotype	53

#### **Krankheit mit ACA**

Bedingung	% Ausdehnung
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

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

### Vergleich von ACA ELISA

		IMMCO ACA Screen		
		POS (+)	NEG (-)	TOT (=)
Immuli <sup>TM</sup>	POS (+)	31	0	31
ACA IgG/A/M	NEG (-)	2	42	44
	TOT (=)	33	42	75

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%  
relative sensitivity/sensibilit  relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivit t/sensibilit  relativa/sensibilidade relativa: 100.0%  
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Präzision:

Zwei Proben mit bekannten Konzentrationen von ACA wurden in 10 Verdoppelungen über eine Zeitdauer von zwei Wochen geprüft. Intra- und Zwischen-Platte Variationskoeffizient (CV) waren, wie folgt:

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Wiederaufnahme

Probestücke mit bekannten Konzentrationen von ACA wurden mit einem anderen ACA Positiv- Probestück gemischt. Die ACA Werte der Misch probest cke wurden festgestellt und Wiederaufnahme wurde errechnet.

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recupera�o
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2



# ImmuLisa™ Anti-Cardiolipina Anticorpi (ACA) Screen ELISA

IVD

REF 1118S ACA Screen 96 determinazioni

ImmuLisa™ ACA ELISA è un test immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi cardiolipina nel siero umano. La presenza di anticorpi anticardiolipina può essere utilizzata come ausilio per valutare il rischio di trombosi in pazienti affetti da sindrome del antifosfolipide.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi antifosfolipidica sono un gruppo eterogeneo dei autoanticorpo contro i fosfolipidi negativamente caricati <sup>1</sup>. Sono rilevati soprattutto dalla prova dell'anticorpo anti-cardiolipina (ACA), dalla prova falso positivo biologica per la sifilide e dalla prova l'anticoagulante tipo lupus. Queste tre prove rilevano gli anticorpi relativi, ma non necessariamente identici. Quindi, più di uno di queste prove è necessario a volte da identificare gli anticorpi antifosfolipidica.

Di varie prove per la rilevazione degli anticorpi antifosfolipidica, la prova dell'anticorpo anti-cardiolipina effettuata da ELISA è più sensibili <sup>12</sup>. La presenza degli aiuti degli anticorpi anti-cardiolipina per identificare i pazienti al rischio di trombosi venosa e arteriosa accompagnata spesso da trombocitopenia, o "sindrome antifosfolipidica" <sup>1-12</sup>. La sindrome antifosfolipidica si presenta il più comunemente in pazienti con lupus eritematoso sistemico (SLE) o altri disturbi simili al lupus dove i test di verifica per SLE non sono compiuti <sup>5-7</sup>. I livelli elevati degli anticorpi anti-cardiolipina si presentano nella trombosi, nella perdita fetale, nella trombocitopenia ed in parecchi altri disordini <sup>1-15</sup>. I bassi livelli degli anticorpi anti-cardiolipina sono trovati in una varietà di disordini clinici che sono indipendenti dalla sindrome antifosfolipidica. Di conseguenza, i bassi livelli di questi anticorpi sono di importanza limitata.

Gli anticorpi del anti-cardiolipina del tipo IgA e di IgG sembrano essere associati più molto attentamente con la sindrome antifosfolipidica che gli anticorpi IgM. Tuttavia, gli anticorpi IgM sembrano di più essere influenzati dal trattamento <sup>5,10</sup>. I bassi livelli degli anticorpi IgM possono essere identificati in altre malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, Syndrome dello Sjögren primario, il lupus eritematoso, la malattia di Lyme e la sifilide indotti droga <sup>8,10</sup>.

## PRINCIPIO DELLA METODICA

L'antigene cardiolipina è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, la calibratore, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli anticorpi anti-cardiolipina eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo anti-umane marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana del categoria adatto. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umane marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di anticorpi anti-cardiolipina confrontando la densità ottica del campione. I risultati sono riportati in unità ELISA per millilitre (EU/ml).

## REAGENTI

### Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

### Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

### Materiali forniti

ImmuLisa™ ACA Screen ELISA **REF** 1118S

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE ACA</b>	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene cardiopalina
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR ACA</b> *	calibratore (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL + ACA</b> *	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> *	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluyente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. <b>Proteggere da luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	soluzione bloccante
2	<b>BUF WASH</b>	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala
*	Contiene < 0.1% NaN <sub>3</sub>	

### Materiali richiesti ma non forniti

Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000  $\mu$ L  
Puntali monouso per micropipette  
Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL  
Acqua distillata o deionizzata  
Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm  
Bottiglia per tampone di lavaggio  
Temporizzatore  
Carta assorbente

### Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici. Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

### METODICA

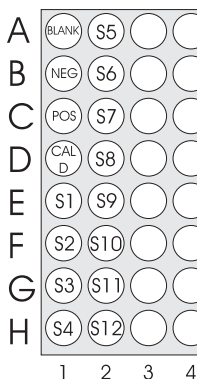
#### Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluizioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essicante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione dei reagentes.

#### Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. Preparare una diluizione di **1:201** dei campioni mescolando **5  $\mu$ l** dei campioni con **1.0 ml** di diluente per campioni.
4. Rimuova i microwells richiesti dal sacchetto e restituisca le strisce inutilizzate nel sacchetto sigillato al frigorifero. Disponga saldamente i microwells nel supporto fornito supplemento.
5. Distribuire 100  $\mu$ L di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.

**Nota:** Includere una posizione con **100  $\mu$ l** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione. La capacità di assorbimento di questo pozzetto non dovrebbe essere più grande di 0.3.



6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µL di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
8. Distribuire 100µL di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
11. Distribuire 100µL di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio della piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

## Controllo di qualità

La calibratore, controllo positivo e controllo negativo e uno spazio in bianco devono essere fatti funzionare con ogni analisi per verificare l'integrità e l'esattezza della prova. La lettura di capacità di assorbimento dello spazio in bianco dovrebbe essere < 0.3. Il calibratore dovrebbe avere un OD di 1.0, altrimenti la prova deve essere ripetuta. Il controllo negativo deve essere < 20 EU/ml. Se la prova è funzionata due volte, la media delle due letture dovrebbe essere presa per EU/ml di determinazione. Mentre realizza le determinazioni qualitative, il OD di calibratore deve essere più grande di quello del controllo negativo e di meno che il OD del controllo positivo.

## RISULTATI

### Calcolo dei risultati

Il seguente metodo dovrebbe essere usato per determinare i risultati positivi o negativi per ACA.

$$\frac{\text{OD di Esempiare}}{\text{OD di Calibratore}} \times \text{EU/ml de Calibratore} = \text{EU/ml di Esempiare}$$

## Interpretazione

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

La letteratura suggerisce che i bassi livelli del positivo ACA si presentano in una varietà di disordini relativi alla sindrome dell'anticorpo antifosfolipidica. I ricercatori suggeriscono la diagnosi della sindrome dell'anticorpo antifosfolipidica soltanto quando i risultati della prova sono moderatamente o altamente positivi <sup>14</sup>.

## Limitazioni del test

Non è possibile giungere alla diagnosi solo sulla base dei risultati del test ACA. Questi risultati devono essere interpretati assieme ai riscontri fisici. Quando si riscontra titoli negativi di ACA in presenza di indicazioni cliniche, è opportuno eseguire ulteriori analisi come l'anticoagulante tipo lupus.

Si riscontano livelli elevati di ACA in una elevata percentuale di pazienti affetti da sifilide attiva confermata o a sieropositività. È necessario eseguire delle analisi per escludere la sifilide. Gli ACA possono essere presenti per un breve periodo in concomitanza con numerose infezioni. Nei pazienti risultati positivi agli ACA è opportuno ripetere il test dopo un periodo di attesa adeguato.

## VALORI ATTESI

L'incidenza di ACA in vari stati di malattia è ricapitolata sotto:

### ***Incidenza di ACA in SLE <sup>15,18</sup>***

Tipo dell'anticorpo	% Incidenza
IgG	39-44
IgA	17-57
IgM	5-33
Any isotype	53

### ***Malattia con ACA***

Malattia	% Incidenza
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

## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Confronto di ELISA ACA

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

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%

relative sensitivity/sensibilité relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivität/sensibilità relativa/sensibilidade relativa: 100.0%

relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Precisione:

Due esemplari con le concentrazioni conosciute di ACA si sono analizzati in 10 repliche durante due settimane. Intra- e inter-piastra coefficiente di variazione (CV) era come segue:

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Recupero:

Gli esemplari con le concentrazioni conosciute di ACA sono stati mescolati con un altro esemplare del positive ACA. I valori di ACA degli esemplari sono stati determinati ed il recupero è stato calcolato.

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recuperação
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2



# ImmuLisa™ Anti-Cardiolipina Anticorpos (ACA) Screen ELISA

IVD

REF 1118S ACA Screen 96 determinações

ImmuLisa™ ACA ELISA é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-cardiolipina de IgG, IgA e IgM no soro humano, em avaliar o risco de trombose, em indivíduos com o síndrome do anti-phospholipid.

## SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

Os anticorpos de antifosfolípidos são um grupo heterogêneo dos autoanticorpos de encontro aos fosfolípidos negativamente carregados <sup>1</sup>. São detectados primeiramente pelo teste do anticorpos anti cardiolipina (ACA), pelo teste positivo falso biológico para o sífilis e pelo teste do anticoagulante do lupus. Estes três testes detectam anticorpos relacionados, mas não necessariamente idênticos. Assim, mais de um destes testes é às vezes necessário para identificar anticorpos antifosfolípidos.

Dos vários testes para a detecção de anticorpos antifosfolípidos, o teste do anti cardiolipina executado por ELISA é os mais sensíveis <sup>2</sup>. A presença das ajudas dos ACA para identificar pacientes no risco de trombozes venosas e arteriais acompanhado frequentemente pelo trombocytopenia, ou “síndrome anti-fosfolípídico” <sup>1-12</sup>. O síndrome anti-fosfolípídico ocorre o mais geralmente nos pacientes com o Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) ou outras desordens semelhantes ao lupus onde os critérios para SLE não são cumpridos <sup>5-7</sup>. Os níveis elevados de ACA ocorrem no trombose, no trombocytopenia e nos diversos outros <sup>1-15</sup>. Os níveis baixos de ACA são encontrados em uma variedade dos doenças clínicos que não são relacionadas ao síndrome anti-fosfolípídico. Conseqüentemente, os níveis baixos destes anticorpos são de significado limitado.

Os ACA da classe IgG e de IgA parecem ser associados mais próxima com o síndrome anti-fosfolípídico do que os anticorpos da classe IgM. Entretanto, os anticorpos IgM parecem ser influenciados mais pelo tratamento <sup>5,10</sup>. Os níveis baixos de anticorpos IgM podem ser identificados em outras doenças autoimunes tais como o artritis reumatoide, o Síndrome de Sjögren preliminar, o Lupus Eritematoso, a doença de Lyme, e o sífilis induzidos droga <sup>8,10</sup>.

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os poços da microplaca de poliestireno, encontram-se revestidos com antígenos de cardiolipina. A placa é obstruída para reduzir o emperramento não é específica. Os controles, calibradores e as amostras diluídas são pipetados nos diferentes poços, permitindo que os anticorpos específicos anti-cardiolipina presentes se liguem ao antígeno imobilizado. Depois de proceder à lavagem dos poços, para retirar a amostra não ligada, adiciona-se o conjugado anti humano marcado. Estes anticorpos ligam especificamente ao imunoglobulina humana da classe apropriada. Depois da segunda lavagem, para retirar o excesso de conjugado, adiciona-se o substrato (pNPP) que provoca uma alteração da cor na presença do Conjugado. Após adição da solução de parada a presença ou ausência de anticorpos anti-cardiolipina é determinada por comparação da densidade óptica da amostra com a densidade óptica. Os resultados em unidades ELISA (EU/ml).

## COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO

### Precauções particulares de conservação

Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até a data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.

Não usar se o reagente não estiver desobstruído.

Tampão de lavagem: Adicionar a água destilada ou deionizada para o volume do 1L.

Micropoços: Usar uma vez somente.

### Precauções

Todo o material de origem humana, utilizado na preparação dos controles para este produto foi testado e deu resultados negativos para testes aprovados pela FDA em relação a anticorpos anti HBs Ag, HIV e HCV. Contudo nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência destes anticorpos ou outros agentes infecciosos. Assim os controles e calibradores devem ser manipulados como material potencialmente infectante.

A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é considerado venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. Pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão ao deitarmos fora os restos de reagentes devemos deixar correr água em quantidade suficiente para evitar a formação destas substâncias.

A Substituição de componentes do dispositivo pode originar resultados inconsistentes.

Usar técnicas de laboratório boas minimizar a contaminação microbial e química.

Não usar após a data de expiração.

### Material fornecido

ImmuLisa™ ACA ScreenELISA

**REF** 1118S

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 96 determinações cada uma.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>ACA</b>	96 micropoços partilhada, cardioplipina
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>ACA</b> *	calibrador ( <i>tampão verde</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>ACA</b> *	controle positivo ( <i>tampão vermelho</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	controle negativo ( <i>tampão branco</i> ), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 12 ml	<b>CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	conjugado fos. alc. Cor-de-rosa codificada cor.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	diluinte de amostras. Azul codificado cor.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	substrato enzime. Contem pNPP. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	solução de parada
2	<b>BUF WASH</b>	tampão de lavagem do 1 litro/viale

\* Contem < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Material necessário não fornecido com o kit

Micropipetas de 5 - 1000 µl  
Pontas descartáveis para as micropipetas  
Tubos para diluições de 4 ml de volume  
Água destilada ou desionizada  
Fotometro para leitura de microplaca, com filtro de 405 nm  
Frasco para tampão de lavagem  
Temporizador  
Papel absorvente

## Colheita da Amostra

Este procedimento deve ser efectuado com soro. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras hemolizadas ou lipémicas devem ser evitadas.

Armazenar as amostras á temperatura ambiente apenas durante 8 horas. Se o teste não for efectuado em 8 horas, guardar as amostras a 2-8°C. Se o teste não for efectuado em 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a temperatura inferior. Evitar congelar-se e aquecer-se repetidos.

## MÉTODO

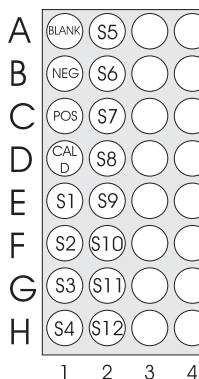
### Antes de Iniciar

- Antes de começar o teste leu estas instruções com cuidado.
- Todos os componentes devem encontrar-se á temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos antes de usar. Materiais do retorno ao refrigerador imediatamente depois do uso.
- Preparar todas as diluições dos espécimes pacientes antes de começar o teste.
- **Guardar imediatamente as restantes estripes na saqueta e selar convenientemente para minimizar a exposição ao vapor de água.**
- Lavagem: A técnica boa é crítica. Uma arruela automatizada do microplaca é recomendada.
- Usar uma pipeta capaz de entregar 8 posições simultaneamente. Isto apressa o processo e fornece-o por um tempo mais uniforme.
- O sincronismo cuidadoso é importante. Os períodos das incubações começam após ter dispensado líquidos.

### Técnica

1. **ANTES DE INICIAR TODOS OS COMPONENTES DEVEM ENCONTRAR-SE Á TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).**
2. Usar o registro do protocolo anotar a posição dos espécimes no microplaca. É prática boa do laboratório testar espécimes na duplicata.
3. Preparar uma diluição de **1:201** do espécime paciente misturando **5 µl** do espécime paciente com **1.0 ml** de diluente de amostras.
4. Remova os microwells requeridos do malote e retorne tiras não utilizadas no malote selado ao refrigerador. Coloque firmemente os microwells no suporte fornecido acréscimo.
5. Pipetar 100 µl de cada um dos calibradores, das amostras diluidas, do controlo negativo e do controlo positivo para os poços.

**Nota:** Incluir uma posição com **100 µl** do diluente de amostras como um espaço em branco. O valor zero do leitor do microplaca deve ser ajustado usando esta posição. A absorvância deste micropoço não deve ser mais grande de 0.3.



6. Incubar durante 30 minutos á temperatura ambiente.
7. Lavagem: Aspirar os pocitos. Adicionar 200-300 ul de tampão e aspirar novamente. Repetir esta sequencia mais 3 vezes num total de 4 lavagens. Após a ultima lavagem, inverter a placa em papel absorvente para retirar todo o liquido residual. Não secar micropoços completamente.
8. Pipetar 100 µl do conjugado em cada pocito.
9. Incubar os poços durante 30 minutos á temperatura ambiente.
10. Lavagem: Repetir o ponto 7.
11. Dispensar 100 µl do substrato enzime em cada pocito.
12. Incubar durante 30 min, e á temperatura ambiente.
13. Adicionar 100 µl de solução de parada em cada pocito. Manter a mesma sequência para a adição da solução de parada, conforme a sequência anteriormente utilizada para a adição do substrato enzime. Ler a densidade optica (DO) no espaço de 1 hora após para a reacção.
14. Ler a densidade optica (DO) a 405 nm no espaço usando um único ou leitor duplo do microplaca de encontro ao jogo em branco do reagente no absorvância zero.

### Controle De Qualidade

Os calibradore, controle positivo e controle negativo e um espaço em branco devem ser funcionados com cada test para verificar a integridade e a exatidão do teste. A leitura do OD do espaço em branco deve ser < 0.3. O calibrador deve ter um OD não mais menos de 1.0, se não o teste deve ser repetido. O controle negativo deve ser < 20 EU/ml. Se o teste for funcionado na duplicata, o meio das duas leituras deve ser feito exame para EU/ml determinando. Ao executar determinações de qualitativa, o OD de calibradore deve ser mais grande do que aquele do controle negativo e de menos do que o OD do controle positivo.

### RESULTADOS

#### Cálculo dos resultados

O seguinte método deve ser usado determinar resultados positivos ou negativos para ACA.

$$\frac{\text{DO Espécime}}{\text{DO Calibradore}} \times \text{EU/ml Calibradore} = \text{EU/ml Espécime}$$

## Interpretação

A seguinte informação serve somente como uma guia na interpretação dos resultados do laboratório. Cada laboratório deve determinar seus próprios valores normais.

ACA Screen Value Value/Valeur/Valore/Valor/Wert	Interpretation/Interprétation/Interpretazione/ Interpretación/Deutung/Interpretação
<20 EU/ml	Neg (-)
20-25 EU/ml	Borderline/Indéterminé/Indeterminato/Indeterminado/ Unbestimmt
>25 EU/ml	Pos (+)

A literatura sugere que os níveis baixos do positivo ACA ocorrem em uma variedade das doenças não relacionados ao síndrome do anticorpos antifosfolípidos. Os investigadores recomendam o diagnóstico do síndrome do anticorpos antifosfolípidos somente quando os resultados de teste são moderada ou altamente positivos <sup>14</sup>.

## Límites do Método

O diagnóstico não deve ser efectuado somente com base no valor dos ACA. O resultado deve ser considerado conjuntamente com os sinais clínicos.

Quando estamos em presença de sinais clínicos indicadores de doença e o valor de ACA é negativo, devemos efectuar outros testes como o teste do anticoagulante Lúpico e outros. Uma elevada percentagem de doentes seropositivos de sífilis ou na fase activa da doença apresentam valores elevados de ACA. Devem ser efectuados testes confirmatórios, para excluir a sífilis. Os ACA podem aparecer transitoriamente durante muitas infecções. Doentes com resultados positivos de ACA devem ser testados novamente após algum tempo de intervalo.

## VALORES ESPERADOS

A incidência de ACA em várias condições da doença é sumariada abaixo:

### ***Incidência de ACA em SLE*** <sup>15,18</sup>

<b>Anticorpos Isotipos</b>	<b>% Incidência</b>
IgG	39-44
IgA	17-57
IgM	5-33
Alguns isotipo	53

### ***Doenças com ACA***

<b>Doença</b>	<b>% Incidência</b>
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

## CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE ESPECÍFICAS

### Comparação de ELISA ACA

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

relative specificity/spécificité relative/especificidad relativa/relative Spezifität/specificità relativa/especificidade relativa: 95.5%  
relative sensitivity/sensibilit  relative/sensibilidad relativa/relative Sensitivit t/sensibilit  relativa/sensibilidade relativa: 100.0%  
relative agreement/concordance/concordancia relativa/relative Übereinstimmung/concordanza relativa/acordo relativo: 97.3%

### Precisão:

Dois espécimes com concentra es sabidas de ACA foram testados em 10 replicates sobre um período de duas semanas. Intra- e inter-placa coeficiente de varia o (CV) era como segue:

	Intra- plate plaque/piastra/placa/Platte CV	Inter-plate plaque/piastra/placa/Platte CV
1.	7.6%	5.9%
2.	10.4%	6.3%

### Recupera o

Os espécimes com concentra es sabidas de ACA foram misturados com um outro espécime do positivo de ACA. Os valores dos espécimes misturados foram determinados e a recupera o foi calculada.

	ACA added/supplémentaire/ aggiunto/agregado/ hinzugefügt/adicionado	ACA obtained/obtenu/ verificato/obtenido/ erreicht/obtido	% Recovery/Rétablissement/ Recupero/Recuperación/ Wiederaufnahme/Recupera�o
1.	127.0	135.8	106.9
2.	103.8	103.2	99.4
3.	64.3	61.2	95.2

## REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

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

**NOTES:**

**NOTES:**

*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*



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

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)