

ENGLISH

REAADS® Anti-Cardiolipin IgG/IgM Semi-Quantitative Test Kit

For *In Vitro* Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of IgG and IgM anti-cardiolipin antibodies in human serum or plasma.

INTENDED USE

For the detection and semi-quantitation of anti-cardiolipin antibodies in individuals with systemic lupus erythematosus (SLE) and lupus-like disorders (anti-phospholipid syndrome).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Anti-phospholipid antibodies are autoantibodies that react with most negatively charged phospholipids, including cardiolipin (CL).^{1,2} Additionally, anti-phospholipid antibodies are known to prolong *in vitro* phospholipid-dependent coagulation tests and have been historically referred to as the “lupus anticoagulant”.^{1,3,4} Paradoxically, patients with the lupus anticoagulant do not present with abnormal bleeding except in the presence of other hemostatic abnormalities.³

Anti-cardiolipin (aCL) antibodies are frequently found in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). They are also found in patients with other autoimmune diseases, as well as in some individuals with no apparent previous underlying disease.^{1,5,6} Elevated levels of aCL antibodies have been reported to be significantly associated with the presence of both venous and arterial thrombosis, thrombocytopenia, and recurrent fetal loss. The term “anti-phospholipid syndrome” (APS) has been introduced to describe patients who present these clinical manifestations, in association with aCL antibodies or the lupus anticoagulant.^{6,7,8,9,10}

The REAADS Anti-Cardiolipin Test Kit uses a well known ELISA format to detect aCL antibodies in human serum or plasma. Solid-phase immunoassays are generally considered more sensitive¹⁰ and more specific¹¹ for detecting aCL antibodies than coagulation assays. The REAADS Anti-Cardiolipin Test Kit provides rapid, highly reproducible, accurate, and objective results in units that are traceable to an internationally recognized reference preparation. The values for IgG aCL antibodies and IgM aCL antibodies are reported separately in GPL and MPL units, respectively.

PRINCIPLE OF THE TEST

The test is performed as an indirect ELISA. Diluted serum samples, calibrator sera, and controls are incubated in cardiolipin coated microwells, allowing aCL antibodies present in the samples to react with the immobilized antigen. After the removal of unbound serum proteins by washing, antibodies specific for human IgG or IgM labeled with horseradish peroxidase (HRP) are added forming complexes with the cardiolipin bound antibodies. Two enzyme-conjugated antibody solutions are provided, one specific for human IgG antibodies and one specific for human IgM antibodies. The concentration of IgG aCL antibodies and IgM aCL antibodies must be determined separately. Following another washing step, the bound enzyme-antibody conjugate is assayed by the addition of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂) as the chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity proportional to the serum concentration of aCL antibodies.

Results are obtained by reading the O.D. (optical density or absorbance) of each well with a spectrophotometer. Calibrator sera are provided, with the IgG and IgM aCL concentrations expressed in GPL or MPL units, respectively. These units are traceable to the internationally recognized preparations of the Phospholipid Standardization Laboratory, University of Louisville. The user has the option of running either a single point calibrator or a four-point calibration curve. For single point calibration, dividing the concentration value of the calibrator sera by the O.D. value of the calibrator provides a conversion factor (one for IgG and one for IgM aCL). The O.D. values of all the other samples are multiplied by the conversion factors to obtain IgG and IgM aCL antibody concentrations in standard units. One GPL unit is equivalent to 1 µg/mL of an affinity purified standard IgG sample, and one MPL unit is equivalent to 1 µg/mL of an affinity purified standard IgM sample.¹² For multipoint calibration, perform a linear regression analysis with calibrator values against calibrator O.D.s. Control and patient results are determined from the calibration curve.

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Anti-Cardiolipin 96-microwell Test Kit contains the following reagents (volumes may vary depending on kit size and configuration):



- 96 stabilized beef heart cardiolipin (diphosphatidyl glycerol) coated microwells (12 strips of 8 breakaway wells), with frame.
- 1 bottle (60 mL) Sample Diluent* (green solution); contains bovine calf serum.
- 3 vials (0.250 mL) aCL IgG Calibrator Sera* (1-high, 2-moderate, 3-low)(human); see vial label for antibody concentration in GPL units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 3 vials (0.250 mL) aCL IgM Calibrator Sera* (1-high, 2-moderate, 3-low)(human); see vial label for antibody concentration in MPL units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 1 vial (0.250 mL) aCL IgG Positive Control Serum* (human); see vial label for expected GPL range.
- 1 vial (0.250 mL) aCL IgM Positive Control Serum* (human); see vial label for expected MPL range.
- 1 vial (0.250 mL) aCL Normal Control Serum* (human); see vial label for expected GPL and MPL ranges.
- 1 bottle (15 mL) anti-human IgG (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (blue solution).
- 1 bottle (15 mL) anti-human IgM (goat) HRP-Conjugated Antibody Solution (red solution).
- 1 bottle (15 mL) One Component Substrate (TMB and H₂O₂); ready to use.
- 1 bottle (15 mL) Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 2 bottles (30 mL) Wash Concentrate (33X PBS).

***CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the calibrators and controls included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV, and HIV I & 2 by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Certain components of this product contain sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.
6. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Warning  . Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum is the preferred sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the serum separated from the cells by centrifugation after clot formation. If not tested immediately, specimens should be stored at 2 to 8°C. If specimens are to be stored for more than 72 hours, they should be frozen at -20°C or below. Avoid repeated freezing and thawing. Do not use hemolyzed, icteric, or lipemic serum or plasma as these conditions may cause aberrant results. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

Plasma collected with most anticoagulants except heparin may be used. Blood should be collected by venipuncture and the plasma immediately separated from the cells by centrifugation at 1500g for 10 minutes. The supernatant must be carefully removed after centrifugation to avoid contamination with platelets. Repeating the centrifugation and separation steps may be advisable to minimize platelet contamination. Lysed or aged platelets can react with anti-phospholipid antibodies leading to aberrant results. If not tested immediately, plasma samples should be stored as described for serum.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

REAADS Anti-Cardiolipin Test Kit; see "Reagents" for a complete listing.

Materials Required but not Provided:

- Reagent grade water to prepare PBS wash solution and to zero or blank the plate reader during the final assay step
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 μ L and 1000 μ L, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system
- Disposable gloves
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (with a 650 nm reference if available)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously

Procedural Notes

1. Bring serum samples and kit reagents to room temperature (18-26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage as soon as possible.
2. All dilutions of calibrators, controls, and test sera must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well can be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 μ L of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to zero or blank against an air or a water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution into the bottom of the microwells from a plastic squeeze bottle with a wide tip. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS can cause inconsistent color development of the Substrate Solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Careful controlled timing of all steps is critical. All calibrators, controls, and samples must be added within a five minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18 - 26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use Tween 20 or other detergents in this assay.
13. Do not use kit components beyond expiration date.
14. Do not use kit components from different kit lot numbers.

REAGENT PREPARATION

Wash Solution (PBS): Measure 30 mL of Wash Concentrate (33X PBS) and dilute to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS solution in the refrigerator at 2 - 8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or cross-contamination.

Assay Procedure

1. The assay can be performed with a single point calibration (Calibrator 2) or a four-point calibration curve (Calibrators 1, 2, and 3 plus sample diluent/reagent blank as Calibrator 4 equal to 0 GPL or 0 MPL units). A reagent blank control should be run for each conjugate, IgG and IgM, with the single point and multipoint calibration method; Sample Diluent without serum is added to the well. This well will be treated the same as sample wells in subsequent assay steps.
2. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
3. Prepare a 1:50 dilution of the calibrators, controls, and patient samples in Sample Diluent (green solution); e.g., 10 μ L sample added to 490 μ L Sample Diluent equals a 1:50 sample dilution.
4. Add 100 μ L of diluted calibrators (including the reagent blank/Calibrator 4), controls, and patient samples to the appropriate microwells.
5. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.

6. Wash 4 times with PBS. Each well should be filled with PBS per wash. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
7. Add 100 µL anti-human IgG HRP-Conjugated Antibody Solution (blue) to the wells corresponding to the IgG calibrator, controls, reagent blank, and patient samples. Add 100 µL anti-human IgM HRP Conjugated Antibody Solution (red) to the wells corresponding to the IgM calibrator, controls, reagent blank, and patient samples.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solutions. Take care not to allow cross-contamination of anti-IgG and anti-IgM Antibody Conjugate Solutions.
9. Wash 4 times with PBS as in step 6. Use a snapping motion to drain the liquid and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.
10. Add 100 µL One Component Substrate to each well and incubate for 10 minutes at room temperature. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
11. Add 100 µL Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue substrate will turn yellow and colorless substrate will remain colorless. Blank or zero the plate reader against an air or a water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm. The O.D. values should be measured within 5 minutes after the addition of Stopping Solution.

RESULTS

Single Point Calibration

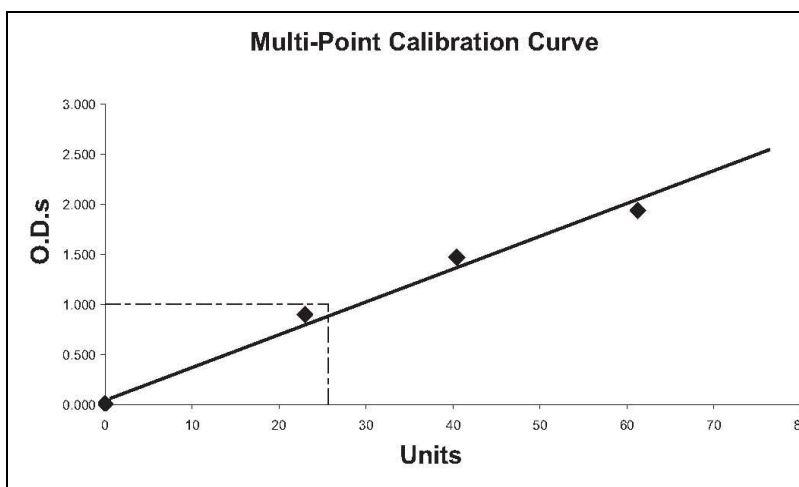
1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of Calibrator 2, controls, and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on the vial label) by the O.D. or mean O.D. value of the calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the O.D. or mean O.D. value for each of the controls and patient samples by the appropriate conversion factor to obtain a concentration value in GPL or MPL units.

<p>Conversion Factor = <u>Anti-cardiolipin concentration of Calibrator 2 (GPL or MPL)</u> Absorbance value of the Calibrator 2 (O.D. – G or M)</p> <p>Anti-cardiolipin concentration of sample = Conversion Factor X Absorbance of the sample (O.D.)</p>
--

4. The conversion factor must be calculated for both calibrators for each assay run. Using a conversion factor from another assay or interchanging GPL and MPL conversion factors will invalidate the results.

Multi-Point Curve Calibration

1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of the calibrators, controls and patient samples were performed.
2. Perform linear regression or quadratic/2nd order polynomial regression analysis with the four calibrator values against the mean O.D.s for each calibrator. (See vial labels for GPL or MPL units. Calibrator 4 [sample diluent] is equal to 0 GPL or 0 MPL units)
3. The calibrator curve can be plotted either automatically using a validated software program or manually with graph paper. It is recommended to use a zero intercept when generating the regression line to avoid negative values. If this option is not available, any negative values should be reported as zero units. When generating the curve manually, draw a best fit line through the plotted points using a zero intercept.
4. Determine the control and patient sample values from the calibrator curve.
5. Example of a multi-point curve calibration.



Using the example calibration curve provided, a specimen O.D. of 1.000 at 450 nm would correspond to a calculated value of 26.2 units. The calibration curve provided is an example only and should not be used to calculate patient results. A new calibration curve should be performed with every test run.

QUALITY CONTROL

1. The O.D. value of Calibrator 2 should be at least 0.600 to assure that the kit is functioning properly. Calibrator 2 O.D. readings of less than 0.600 may indicate that the kit is no longer suitable for use.
2. The O.D. of Calibrator 4 or reagent blank should be less than 0.050 when the spectrophotometer has been blanked against an air or water well. Readings greater than 0.050 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The anti-cardiolipin values obtained for the control sera should be within the ranges indicated on the container labels. Occasional small deviations outside these ranges are acceptable.
4. O.D. values for duplicates (if performed) of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
5. Each laboratory should periodically determine its own normal cut-off values for the appropriate population of patients. See Performance Characteristics, Clinical Specificity, as an example.
6. Samples with anti-cardiolipin values greater than 100 GPL or 60 MPL may be reported as “greater than 100 GPL or 60 MPL”.
7. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

EXPECTED VALUES

Normal Range:

Serum samples from 94 healthy blood donors were tested and the following normal range established (mean + 2 SD):

- Less than 23 GPL
- Less than 11 MPL

EXPECTED PREVALENCE

SLE:

Serum samples from 149 individuals with SLE were tested with the kit. Thirty-one of the samples (21%) were positive for IgG anti-cardiolipin antibodies. Fifteen of the samples (10%) were positive for IgM anti-cardiolipin antibodies. No correlation was found between anti-cardiolipin antibody levels and anti-dsDNA antibody levels or disease activity. Monoclonal antibodies specific for dsDNA and ssDNA have also been tested in the assay and were shown to be nonreactive with the cardiolipin coated microwells.

Other Disease States:

Twenty-four serum samples from patients with osteoarthritis (OA) were tested in the assay. Only one was positive for IgG aCL antibodies. None were positive for IgM aCL antibodies.

Ninety-three serum samples from patients with progressive systemic sclerosis (PSS) were tested in the assay. Twelve of the samples (13%) were positive for IgG aCL, and three of the samples (3%) were positive for IgM aCL.

The clinical significance of positive results in disease states other than SLE is still under investigation.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Normal Samples:

Serum samples from 94 healthy blood donors were assayed for the presence of IgG and IgM aCL antibodies. The normal cut-off was calculated as the mean GPL or MPL antibody level plus two standard deviations. The cut-off value was calculated separately for IgG and IgM antibodies. The calculated values are 23 GPL for IgG and 11 MPL for IgM. Using these cut-off values, the assay is 97% specific for IgG antibodies and 96% specific for IgM antibodies.

Disease Controls:

Serum samples from 14 patients with SLE or a lupus-like disorder with no history of thrombosis or other features of the antiphospholipid syndrome, were tested in the assay. None of the samples were positive for IgG aCL antibodies. One sample was positive for IgM aCL antibodies. The overall specificity of the assay for this sample population was 93%.

Clinical Sensitivity Serum samples from 18 patients with SLE or a lupus-like disorder, known to have had at least one thrombotic event, were tested in the assay. Eleven samples were positive for a sensitivity of 61% in this sample population. Seven of the samples had elevated levels of IgG aCL antibodies only, three samples had elevated levels of both IgG and IgM aCL antibodies, and one sample was positive for IgM aCL antibodies only.

Precision Two samples with known GPL values (one low and one high) and two samples with known MPL values (one low and one high) were assayed in 28 replicates on three different occasions. The intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) are presented in the following table. The reported intraassay coefficient of variation is the mean of the three separate intraassay CVs.

Sample (aCL conc.)	Mean Intraassay CV	Interassay CV
Low (20.1 GPL)	7.7%	11.9%
Low (16.4 MPL)	10.5%	11.6%
High (48.8 GPL)	9.4%	13.2%
High (64.6 MPL)	7.4%	10.9%

Recovery Two samples with known GPL concentration values (one low, LS, and one high, HS) were diluted 1:1 with standards containing known amounts of IgG anti-cardiolipin antibodies. The calculated, observed, and recovery values are presented in the following table. Anti-cardiolipin concentration values are reported in GPL units.

Sample	<u>GPL Concentration</u>		Recovery Value (%)
	Calculated	Observed	
LS	--	11.0	--
LS + 6.3	8.7	8.8	101%
LS + 12.5	11.8	10.6	89.9%
LS + 25	18.0	17.0	94.2%
LS + 50	30.5	25.6	83.8%
HS	--	35.9	--
HS + 6.3	21.1	24.7	115%
HS + 12.5	24.2	27.7	115%
HS + 2.5	30.5	31.8	104%
HS + 50	43.0	39.8	92.6%

Two samples with known MPL concentration values (one low, LS, and one high, HS) were diluted 1:1 with standards containing known amounts of IgM anti-cardiolipin antibodies. The calculated, observed, and recovery values are presented in the table below. Anti-cardiolipin concentration values are reported in MPL units.

Sample	MPL Concentration		Recovery Value (%)
	Calculated	Observed	
LS	--	7.1	--
LS + 6.9	7.0	8.6	122%
LS + 13.8	10.5	12.4	118%
LS + 27.5	17.3	19.0	110%
LS + 55	31.1	30.6	98.4%
HS	--	47.1	--
HS + 6.9	27.0	35.2	130%
HS + 13.8	30.5	37.6	123%
HS + 27.5	37.3	39.4	106%
HS + 55	51.1	52.4	102%

LIMITATIONS OF THE TEST

The anti-cardiolipin antibody concentration values obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. If clinical findings suggest the presence of anti-phospholipid antibodies and the patient is negative for anti-cardiolipin antibodies, some investigators recommend testing for the lupus anticoagulant to confirm the negative result. A patient is considered positive for anti-phospholipid antibodies if one or both of the tests give positive results.¹³

Patients with current or prior syphilis infections may have a positive result in the REAADS aCL assay without increased risk of thrombosis. In a study of 23 patients with confirmed syphilis (FTA-Abs positive), nine of the samples (39%) were positive in the REAADS aCL assay. If a patient's history is consistent with a diagnosis of syphilis infection, this should be confirmed or ruled out by an assay specific for anti-treponemal antibodies. Anti-cardiolipin antibodies can appear transiently at low levels during many infections. If a patient first tests positive while there are clinical signs of infection, the test should be repeated after an interval of six months.¹⁴

WARRANTY

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone (303) 457-4345, fax (303) 457-4519, or contact a Corgenix authorized distributor.

REAADS®
Testkit zur semiquantitativen Bestimmung von Anti-Kardiolipin IgG/IgM

***In-vitro*-Diagnostikum**

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur halbquantitativen Bestimmung von IgG und IgM anti-Kardiolipin (aCL) Antikörper in menschlichem Serum oder Plasma.

ANWENDUNGSGEBIET

Nachweis und semiquantitative Bestimmung von Anti-Kardiolipin-Antikörpern bei Personen mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) oder lupusartigen Erkrankungen (Antiphospholipid-Syndrom).

TESTPRINZIP

Der Test wird als indirekter ELISA durchgeführt. Verdünnte Serumproben, Kalibratorseren und Kontrollen werden in Kardiolipin-beschichteten Mikrozellen inkubiert, wobei die in den Proben vorhandenen aCL-Antikörper mit dem Antigen reagieren. Nach dem Auswaschen von ungebundenen Serumproteinen werden mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte, für Human-IgG oder -IgM spezifische Antikörper zugefügt, die dann mit den Kardiolipin-gebundenen Antikörpern komplexieren. Der Kit enthält zwei enzymkonjugierte Antikörperlösungen, eine für Human-IgG-Antikörper und eine zweite für Human-IgM-Antikörper spezifische Lösung. Die Konzentration der IgG-aCL- und der IgM-aCL-Antikörper muss jeweils separat bestimmt werden. Nach einem weiteren Waschschrift wird das gebundene Enzym-Antikörper-Konjugat durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂), als chromogenes Substrat bestimmt. In den Zellen entwickelt sich eine Farbe, deren Intensität sich proportional zur Konzentration der aCL-Antikörper im Serum verhält.

Die Ergebnisse erhält man durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bzw. Extinktion in allen Zellen mit einem Spektrophotometer. Kalibratorseren werden mit Angabe der IgG-aCL- und IgM-aCL-Konzentrationen in GPL-bzw. MPL-Einheiten ausgedrückt zur Verfügung gestellt. Diese Einheiten lassen sich auf die international anerkannten Zubereitungen des Phospholipid Standardization Laboratory der University of Louisville zurückführen. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Vierpunkt-Kalibrationskurve verwenden. Bei der Einpunktkalibration wird zur Berechnung des Umrechnungsfaktors (je ein Faktor für IgG und IgM) die Konzentration der Kalibratorseren durch den OD-Wert des Kalibrators dividiert. Die OD-Werte aller anderen Proben werden zur Berechnung der IgG- und IgM-aCL-Antikörperkonzentration in Standardeinheiten mit den Umrechnungsfaktoren multipliziert. Eine GPL-Einheit entspricht 1 µg/ml einer affinitätsgereinigten IgG-Standardprobe, und eine MPL-Einheit entspricht 1 µg/ml einer affinitätsgereinigten IgM-Standardprobe.¹² Zur Mehrpunktkalibration wird eine lineare Regressionsanalyse mit Kalibratorwerten gegen die Kalibrator-OD-Werte durchgeführt. Die Ergebnisse für Kontrollen und Patientenproben werden mit Hilfe der Kalibrationskurve bestimmt.

REAGENZIEN

Bei 2 - 8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Anti-Kardiolipin-Testkit mit 96 Mikrozellen enthält die folgenden Reagenzien **(die Volumen hängen von Kitgröße und -konfiguration ab)**:

- 96 stabilisierte und mit Rinderherz-Kardiolipin (Diphosphatidylglycerin) beschichtete Mikrozellen (12 Streifen mit je 8 Abreißzellen) mit Halterung (Antigen Coated Microwells).
- 1 Fläschchen (60 ml) Probenverdünner* (grüne Lösung); enthält Kälberserum (Sample Diluent).
- 3 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgG-Kalibratorseren* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); die Antikörperkonzentration in GPL-Einheiten ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden (aCL IgG Calibrator 1, aCL IgG Calibrator 2, aCL IgG Calibrator 3).
- 3 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgM-Kalibratorseren* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); die Antikörperkonzentration in MPL-Einheiten ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden (aCL IgM Calibrator 1, aCL IgM Calibrator 2, aCL IgM Calibrator 3).

- 1 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgG-Positivkontrollserum*; der erwartete GPL-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben (aCL IgG Positive Control).
- 1 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgM-Positivkontrollserum*; der erwartete MPL-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben (aCL IgM Positive Control).
- 1 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-Normalkontrollserum*; die erwarteten GPL- und MPL-Bereiche sind auf dem Fläschchenetikett angegeben (aCL IgG/IgM Normal Control).
- 1 Fläschchen (15 ml) Antihuman-IgG-Antikörperlösung, HRP-konjugiert (Ziege) (blaue Lösung) (aCL IgG HRP-Conjugated Antibody).
- 1 Fläschchen (15 ml) Antihuman-IgM-Antikörperlösung, HRP-konjugiert (Ziege) (rote Lösung) (aCL IgM HRP-Conjugated Antibody).
- 1 Fläschchen (15 ml) Einkomponentensubstrat (TMB und H₂O₂), gebrauchsfertig (One-component Substrate).
- 1 Fläschchen (15 ml) Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) (Stopping Solution).
- 2 Fläschchen (30 ml) Waschkonzentrat (33X PBS) (Wash Concentrate).

***ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung der in diesem Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV und HIV 1 und 2 reagierten. Trotzdem sollten alle Humanblutprodukte einschließlich Patientenproben als potenzielle Infektionsquellen gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Bestimmte Bestandteile dieses Produkts enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Es ist bekannt, dass Natriumazid Blei- und Kupferazide bildet, wenn es in Kontakt mit diesen Metallen kommt. Diese Metallazide sind explosiv. Azidhaltige Lösungen müssen beim Ausgießen in den Abfluss mit reichlich Wasser verdünnt werden, um eine Ansammlung explosiver Metallazide in den Wasserrohren zu vermeiden.
6. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46).

Waarschuwing . Risque biologique .

PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Serum ist die bevorzugte Probenmatrix. Vollblut sollte mittels Venenpunktion gewonnen und nach der Gerinnung zur Trennung der Zellen vom Serum zentrifugiert werden. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2 - 8 °C aufzubewahren. Wenn die Proben länger als 72 Stunden nicht analysiert werden, sind sie bei -20 °C oder darunter aufzubewahren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Hämolyisiertes, ikterisches oder lipämisches Serum oder Plasma darf nicht verwendet werden, da dies die Ergebnisse verfälschen kann. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, sollten vor dem Test durch Zentrifugation geklärt werden.

In Gegenwart von Antikoagulanzen mit Ausnahme von Heparin gewonnenes Plasma kann verwendet werden. Blut sollte durch Venenpunktion abgenommen und das Plasma sofort durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 g von den Zellen getrennt werden. Der Überstand muss nach dem Zentrifugieren sorgfältig entfernt werden, um eine Kontamination mit Blutplättchen zu vermeiden. Wiederholtes Zentrifugieren und Separieren kann eine Blutplättchenkontamination minimieren. Lysierte oder zu lange gelagerte Blutplättchen können mit Antiphospholipid-Antikörpern reagieren und zu falschen Resultaten führen. Werden die Plasmaproben nicht sofort analysiert, sind sie wie für Serum beschrieben zu lagern.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

REAADS Anti-Kardiolipin-Testkit; eine vollständige Liste finden Sie unter „Reagenzien“.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien:

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der PBS-Waschlösung und zum Nullabgleich des Platten-Lesegeräts während des letzten Testschritts
- Messzylinder
- Präzisionspipetten zur Abgabe von Volumen zwischen 5 und 1000 µL mit geeigneten Spitzen
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit etwas zurückgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm (mit 650 nm als Referenzwellenlänge, sofern verfügbar)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Zellen gleichzeitig beschickt werden können.

Hinweise zur Durchführung

1. Serumproben und Kitreagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18-26 °C) bringen und gut durchmischen -Schaumbildung vermeiden. Alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien müssen sobald wie möglich wieder gekühlt werden.
2. Kalibratoren, Kontrollen und Testseren dürfen erst kurz vor ihrer Verwendung im Test verdünnt werden.
3. Für jeden Testlauf kann auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. In diese Zelle dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden dieser Zelle direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser hinzugefügt. Das Plattenlesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Waschlösung in der für die Wasser-Blindprobe reservierten Zelle beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. WICHTIG: Wenn überschüssiges PBS nicht restlos entfernt wird, kann es zu einer ungleichmäßigen Farbentwicklung in der Substratlösung kommen.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Zellen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichförmigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Zellen.
7. Die Zeitangaben müssen bei allen Schritten sorgfältig eingehalten werden. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen innerhalb von 5 Minuten zugefügt werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit dem Ende der Reagenzien- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter Raumtemperatur (18 - 26 °C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der primären Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Kein Tween 20 oder andere oberflächenaktive Stoffe in diesem Test verwenden.
13. Die Kitkomponenten nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.
14. Die Komponenten verschiedener Kit-Chargen nicht mischen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschlösung (PBS): 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS) abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 Liter verdünnen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete PBS-Lösung im Kühlschrank bei 2 - 8 °C aufbewahren. Bei den ersten Anzeichen einer mikrobiellen Verunreinigung oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Durchführung des Tests

1. Der Test kann mit Hilfe einer Einpunktkalibration (Kalibrator 2) oder einer Vierpunkt-Kalibrationskurve (Kalibratoren 1,2 und 3 plus Probenverdünner/Blindprobe als Kalibrator 4 entsprechend 0 GPL-bzw. 0 MPL-Einheiten) durchgeführt werden. Für IgG- und IgM-Konjugat sollte jeweils eine Vertiefung als Blindversuch unter Verwendung der Einpunkt und Mehrpunktkalibration dienen. Der Zelle wird Probenverdünner ohne Serum zugesetzt. Diese Zelle wird in den folgenden Testschritten wie Probenzellen behandelt.
2. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und im bereitgestellten Säckchen aufbewahren.
3. Eine 1:50 Verdünnung von Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben im Probenverdünner (grüne Lösung) herstellen; z. B. 10 µl Probe zu 490 µl Probenverdünner entspricht einer Probenverdünnung von 1:50.
4. 100 µl verdünnter Kalibratoren (einschließlich Blindprobe/Kalibrator 4), Kontrollen und Patientenproben in die jeweiligen Mikrozellen übertragen.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrozellen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrozellen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
6. Viermal mit PBS waschen. Jede Zelle sollte bei jedem Waschvorgang mit PBS gefüllt werden. Nach jedem Waschschrift wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Mikrozellen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung mit dem Handgelenk aus den Zellen geschleudert. Der Streifenhalter muss in der Mitte, oben und unten zusammengedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrozellenmodule beim Waschen zu vermeiden. Auf saugfähigem Papier abtupfen, um die Waschlösung restlos zu entfernen. Die Zellen dürfen zwischen den einzelnen Waschschriften nicht austrocknen.
7. 100 µl HRP-konjugierte Anti-Human-IgG-Antikörperlösung (blau) in die Vertiefungen, die für IgG-Kalibrator, Kontrollen, Blindversuch und Patientenproben vorgesehen sind, pipettieren. 100 µl HRP-konjugierte Anti-Human-IgM-Antikörperlösung (rot) in die Zellen, die für IgM-Kalibrator, Kontrollen, Blindprobe und Patientenproben vorgesehen sind, pipettieren.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösungen durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrozellen entleert. Sorgfältig darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der Anti-IgG- und Anti-IgM-Antikörper-Konjugatlösungen kommt.
9. Viermal wie in Schritt 7 beschrieben mit PBS waschen. Nach dem letzten Waschvorgang durch rasche Bewegungen die Flüssigkeit abfließen lassen und auf saugfähigem Papier trocknen. Die Zellen nicht austrocknen lassen.
10. In jede Zelle 100 µl Einkomponentensubstrat geben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Zellen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Zellen blau.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Zelle abgebrochen. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Zellen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während bisher farblos gebliebenes Substrat weiterhin farblos bleibt. Das Plattenlesegerät gegen eine mit Wasser oder Luft gefüllte Vertiefung nullabgleichen. Die optische Dichte (OD) der in den einzelnen Zellen enthaltenen Flüssigkeiten wird bei 450 nm bestimmt. Die OD-Werte sollten innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmt werden.

ERGEBNISSE

Einpunktkalibration

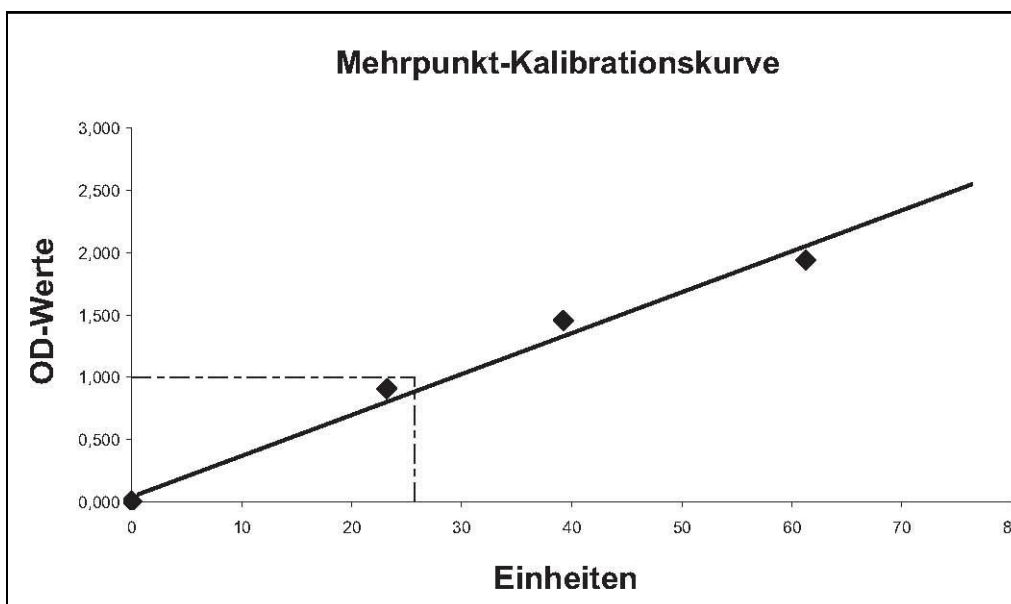
1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibrator 2, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Zur Berechnung des Umrechnungsfaktors die Konzentration von Kalibrator 2 (auf Fläschchenetikett angegeben) durch den OD-Wert bzw. OD-Mittelwert des Kalibratorserums dividieren.
3. Den OD-Wert bzw. OD-Mittelwert jeder Kontrolle und jeder Patientenprobe mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multiplizieren, um den Konzentrationswert in GPL- oder MPL-Einheiten zu erhalten.

$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{Anti-Kardiolipinkonzentration von Kalibrator 2 (GPL oder MPL)}}{\text{Extinktion von Kalibrator 2 (OD - G oder M)}}$$
$$\text{Anti-Kardiolipingehalt der Probe} = \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{Extinktion der Probe (OD)}$$

4. Der Umrechnungsfaktor muss für beide Kalibratoren für jeden Testlauf berechnet werden. Verwendung eines Umrechnungsfaktors aus einem anderen Test oder Vertauschen von GPL- und MPL- Umrechnungsfaktoren führt zu ungültigen Ergebnissen.

Kalibration über Mehrpunktkurve

1. Die OD-Mittelwerte berechnen, wenn Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmungen analysiert wurden.
2. Führen Sie eine lineare Regression oder polynomiale Regressionsanalyse (quadratisch/2. Ordnung) mit den vier Kalibratorwerten gegen die mittleren ODs für jeden Kalibrator durch. (Die GPL- und MPL-Einheiten sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Kalibrator 4 Probenverdünner entspricht 0 GPL- oder 0 MPL-Einheiten)
3. Die Kalibratorkurve kann entweder automatisch mit Hilfe eines validierten Softwareprogramms oder manuell auf Millimeterpapier erstellt werden. Um negative Werte zu vermeiden, sollte beim Erstellen der Regressionskurve ein Achsenabschnitt von Null verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollten etwaige negative Werte als Null angegeben werden. Bei manueller Erstellung der Kurve muss eine Ausgleichsgerade mit Achsenabschnitt Null durch die aufgetragenen Punkte gezogen werden.
4. Mit Hilfe der Kalibrationskurve die Werte für Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
5. Beispiel für eine Mehrpunkt-Kalibrationskurve.



In der als Beispiel verwendeten Kalibrationskurve entspräche eine OD der Probe von 1,000 bei 450 nm einem berechneten Wert von 26,2 Einheiten. Diese Kalibrationskurve dient nur Illustrationszwecken und darf nicht für die Berechnung von Patientenwerten verwendet werden. Zu jedem Testlauf sollte eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Der OD-Wert von Kalibrator 2 muss mindestens 0,600 betragen, damit die ordnungsgemäße Funktion des Kits sichergestellt ist. OD-Werte von weniger als 0,600 für Kalibrator 2 können darauf hinweisen, dass der Kit nicht mehr verwendbar ist.
2. Der OD-Wert für Kalibrator 4 oder Blindversuch sollte unter 0,050 liegen, wenn das Spektrophotometer gegen Luft oder eine mit Wasser gefüllte Vertiefung auf Null gestellt wurde. Werte über 0,050 können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Platte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollseren erhaltenen Anti-Kardioplinwerte müssen mit dem auf der Flasche angegebenen Sollbereich übereinstimmen. Gelegentliche geringe Abweichungen von diesem Bereich sind gestattet.
4. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen, sofern durchgeführt, von Kontrollen oder Patientenproben um nicht mehr als 20% vom OD-Mittelwert abweichen.
5. Jedes Labor sollte regelmäßig seine eigenen Grenzwerte für die jeweilige Patientenpopulation festlegen. Siehe Performance Characteristics, Clinical Specificity als Beispiel.
6. Proben mit Anti-Kardioplinwerten von über 100 GPL oder 60 MPL können als „über 100 GPL oder 60 MPL“ angegeben werden.
7. Bevor die Analysenergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

NORMALWERTE

Normalbereich:

Serumproben von 94 gesunden Probanden wurden getestet und der folgende Normalbereich wurde festgesetzt (Mittelwert + 2 SD):

- Weniger als 23 GPL
- Weniger als 11 MPL

ALLGEMEINE GÜLTIGKEIT

SLE:

Serumproben von 149 Patienten mit SLE wurden mit dem Testkit überprüft. 31 der Proben (21%) reagierten positiv auf IgG-Anti-Kardiolipin-Antikörper. Fünfzehn Proben (10%) reagierten positiv auf IgM-Anti-Kardiolipin-Antikörper. Zwischen den Anti-Kardiolipin-Antikörperspiegeln und den Anti-dsDNA-Antikörperspiegeln oder klinischen Krankheitssymptomen wurde keine Korrelation gefunden. Für dsDNA und ssDNA spezifische monoklonale Antikörper wurden mit dem Test ebenfalls geprüft und erwiesen sich als nichtreaktiv mit den Kardiolipin-beschichteten Mikrozellen.

Andere Krankheiten:

24 Serumproben von Patienten mit Osteoarthritis (OA) wurden mit dem Test geprüft. Nur eine Probe war positiv für IgG-aCL-Antikörper. Keine Probe war positiv für IgM-aCL-Antikörper.

93 Serumproben von Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie (PSS) wurden mit dem Test geprüft. Zwölf der Proben (13%) waren positiv für IgG-aCL und drei der Proben (3%) waren positiv für IgM-aCL.

Die klinische Signifikanz positiver Ergebnisse bei verschiedenen Krankheiten (mit Ausnahme von SLE) wird derzeit noch untersucht.

GRENZEN DES TESTS

Die Anti-Kardiolipin-Antikörperkonzentrationen, die von diesem Test erhalten werden, sind lediglich als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Der Arzt darf diese Ergebnisse nur zusammen mit anderen Informationen wie Anamnese, körperliche Befunde und Resultate anderer diagnostischer Tests interpretieren. Falls klinische Befunde die Anwesenheit von Anti-Phospholipid-Antikörpern anzeigen und das Patientenserum negativ auf Anti-Kardiolipin-Antikörper reagiert, empfehlen einige Forscher einen Test auf Lupus-Antikoagulanzen, um das negative Ergebnis zu bestätigen. Ein Patient ist als positiv für Anti-Phospholipid-Antikörper einzustufen, wenn einer oder beide Tests ein positives Resultat ergeben.¹³

Patienten mit aktueller oder früherer Syphilisinfektion können positive Resultate beim REAADS aCL-Test aufweisen, ohne jedoch einem erhöhten Thromboserisiko ausgesetzt zu sein. In einer Studie mit 23 nachgewiesenen positiven Syphilis-Patienten (FTA-Ak positiv) reagierten neun Proben (39%) positiv im REAADS aCL-Test. Wenn die Anamnese eine Syphilisinfektion nicht ausschließt, sollte dies mit einem auf Anti-Treponemen-Antikörper spezifischen Test bestätigt bzw. entschieden werden. Anti-Kardiolipin-Antikörper können bei vielen Infektionen in niedriger Konzentration vorübergehend vorliegen. Zeigt ein Patient klinische Anzeichen einer Infektion und der erste Test verläuft positiv, sollte er nach 6 Monaten wiederholt werden.¹⁴

GARANTIE

Dieses Produkt wird mit der Garantie geliefert, dass es wie in dieser Packungsbeilage beschrieben funktioniert. Corgenix, Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen bezüglich der Handelbarkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck und haftet in keinem Fall für Folgeschäden.

Unsere technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661 bzw. außerhalb der USA unter +1-303-457-4345. Fax: +1-303-457-4519. Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

REAADS®
Kit de test semi-quantitatif de IgG/IgM anticardiolipine

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Dosage immunoenzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgG et IgM anticardiolipine dans le sérum ou le plasma humain.

UTILISATION ENVISAGÉE

Pour la détection et la semi-quantification des anticorps anticardiolipine chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et de troubles de type lupique (syndrome des antiphospholipides).

PRINCIPE DU TEST

Le test est un dosage immunoenzymatique indirect. Les micropuits enduits de cardiolipine sont incubés avec les échantillons, les sérums étalons et les contrôles dilués. Les anticorps aCL présents se fixent sur l'antigène immobilisé. Après élimination des protéines non liées du sérum par lavage, des anticorps spécifiques des IgG ou IgM humaines couplés à une peroxydase du raifort (PR) sont alors ajoutés formant ainsi des complexes avec les anticorps anticardiolipine déjà fixés. Deux solutions d'anticorps conjugués à des enzymes, respectivement spécifiques pour les anticorps IgG humaine et pour les anticorps IgM humaine, sont fournies. La concentration des anticorps aCL IgG et aCL IgM doit être déterminée séparément. Après un deuxième lavage, le conjugué est révélé par addition du tétraméthylbenzène (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à titre de substrat chromogène. L'intensité de la couleur développée dans les puits est proportionnelle à la concentration des anticorps aCL.

Le résultat s'obtient par lecture de la D.O. (densité optique ou absorbance) de chaque puits dans un spectrophotomètre. Des sérums d'étalonnage sont fournis et les concentrations d'aCL IgG et IgM sont respectivement exprimées en unités GPL et MPL. Ces unités sont liées aux préparations mondialement reconnues du Phospholipid Standardization Laboratory (Laboratoire de normalisation des phospholipides), Université de Louisville. L'utilisateur peut choisir d'utiliser un étalonnage à point unique ou une courbe d'étalonnage à quatre points. Dans le cas d'un étalonnage à point unique, un facteur de conversion individuel pour aCL IgG et pour aCL IgM s'obtient en divisant la valeur de la concentration des sérums de l'étalon par la D.O. Les concentrations des anticorps aCL IgG et IgM de tous les autres échantillons s'obtiennent en multipliant les D.O. de tous les autres échantillons par les facteurs de conversion. Une unité GPL équivaut à 1 µg/ml d'échantillon IgG standard purifié par affinité et une unité MPL équivaut à 1 µg/ml d'échantillon IgM standard purifié par affinité.¹² Dans le cas d'un étalonnage multipoint, effectuer l'analyse par régression linéaire des valeurs de l'étalon comparées aux D.O. de l'étalon. Les résultats des contrôles et des échantillons patient se déterminent à partir de la courbe d'étalonnage.

RÉACTIFS

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.

Chaque kit d'anticardiolipine REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants
(les volumes varient selon l'attribution et la configuration du kit) :

- 96 micropuits (12 barrettes de 8 puits sécables) enduits de cardiolipine de cœur bovin stabilisée (diphosphatidylglycérol), avec cadre (Antigen Coated Microwells).
- 1 bouteille (60 ml) de tampon d'échantillon* (solution verte) ; contient du sérum de veau (Sample Diluent).
- 3 flacons (0,250 ml) de sérum* aCL IgG (humain) étalon (1-élevé, 2-modéré, 3-bas) ; se reporter aux indications fournies sur les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités GPL. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique (aCL IgG Calibrator 1, aCL IgG Calibrator 2, aCL IgG Calibrator 3).
- 3 flacons (0,250 ml) de sérum* aCL IgM (humain) étalon (1-élevé, 2-modéré, 3-bas) ; se reporter aux indications fournies sur les étiquettes des flacons pour la concentration d'anticorps en unités MPL. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique (aCL IgM Calibrator 1, aCL IgM Calibrator 2, aCL IgM Calibrator 3).
- 1 flacon (0,250 ml) de sérum* aCL IgG (humain) positif de contrôle ; se reporter aux indications fournies sur l'étiquette du flacon pour les valeurs attendues (aCL IgG Positive Control).



- 1 flacon (0,250 ml) de sérum* aCL IgM (humain) positif de contrôle ; se reporter aux indications fournies sur l'étiquette du flacon pour les valeurs attendues (aCL IgM Positive Control).
- 1 flacon (0,250 ml) de sérum* aCL (humain) normal de contrôle ; se reporter aux indications fournies sur l'étiquette du flacon pour les valeurs attendues en GPL et MPL (aCL IgG/IgM Normal Control).
- 1 bouteille (15 ml) de conjugué anticorps de chèvre anti-IgG humaine/PR (solution bleue) (aCL IgG HRP-Conjugated Antibody).
- 1 bouteille (15 ml) de conjugué anticorps de chèvre anti-IgM humaine/PR (solution rouge) (aCL IgM HRP-Conjugated Antibody).
- 1 bouteille (15 ml) de substrat à un composant (TMB et H₂O₂) prêt à l'emploi (One-component Substrate).
- 1 bouteille (15 ml) de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) (Stopping Solution).
- 2 bouteilles (30 ml) de concentré de lavage (33X SPTP) (Wash Concentrate).

***ATTENTION : Contient de l'azide de sodium**

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

1. Les sérums humains utilisés pour préparer les étalons et les contrôles inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAG, anti-HCV et anti-HIV 1 & 2 selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons patient, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants de ce produit contiennent de l'azide de sodium à titre d'agent conservateur. L'azide de sodium s'est avéré former des azides de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé au contact de ces métaux. Ces azides métalliques sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être abondamment rincée à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azides métalliques explosifs dans la plomberie.
6. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Avertissement . Biologisches Risiko .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Réaliser les dosages sur sérum de préférence. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le sérum immédiatement séparé des cellules par centrifugation après la formation du caillot. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20 °C ou moins. Éviter de décongeler-recongeler. De même, ne pas utiliser des plasmas ou des sérums hémolysés, ictériques ou lipémiques. Les échantillons contenant visiblement des particules doivent être éclaircis par centrifugation avant de les tester.

Les plasmas prélevés avec la plupart des anticoagulants, excepté l'héparine, peuvent être utilisés. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et le plasma immédiatement séparé des cellules par centrifugation à 1500g pendant 10 minutes. Pour cela, séparer soigneusement le plasma des cellules après la centrifugation, afin d'éviter la contamination par les plaquettes. Répéter l'opération si nécessaire. Des plaquettes lysées ou anciennes peuvent réagir avec les anticorps antiphospholipides et entraîner des résultats aberrants. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons de plasma doivent être stockés de la manière décrite pour le sérum.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni:

Kit de test anticardiolipine REAADS ; voir la liste complète sous « Réactifs ».

Matériel requis mais non fourni:

- Eau pure pour analyse pour préparer la solution mère SPTP et pour mettre à zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 µl et 1 000 µl, avec embout approprié
- Articles en verre convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants à usage unique
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire la densité optique à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanal capables d'alimenter 8 puits simultanément

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons et les réactifs à température ambiante (18 à 26 °C) et bien agiter avant l'emploi ; éviter la formation de mousse. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur.
2. Diluer les étalons, les contrôles et les tests de sérum extemporanément.
3. Un unique puits d'eau à blanc peut être installé sur chaque plaque pour chaque série. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être mis à zéro ou « à vide » sur un puits d'air ou d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. L'utilisation de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de plaque de micro-titration.
5. IMPORTANT : L'élimination imparfaite des résidus SPTP risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de d'alimenter 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
7. Le minutage précis de toutes les étapes est primordial. Il est impératif d'ajouter en moins de cinq minutes tous les étalons, contrôles et échantillons. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Toutes les étapes d'incubation commencent au moment de l'addition du réactif ou de l'échantillon.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26 °C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser de Tween 20 ou d'autres détergents dans ce dosage.
13. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
14. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de lots différents.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Solution mère (SPTP) : Mesurer 30 ml de concentré de lavage (SPTP 33x) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution de SPTP inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.

Procédure de dosage

1. Le dosage peut être effectué avec un étalonnage à point unique (étalon 2) ou une courbe d'étalonnage à quatre points (étalon 1, 2 et 3 plus tampon d'échantillon/réactif à blanc à titre d'étalon 4 égal à 0 unité GPL ou 0 unité MPL). Un réactif à blanc de contrôle doit être analysé pour chaque conjugué IgG et IgM, avec la méthode d'étalonnage aussi bien à point unique que multipoint; du diluant d'échantillon sans sérum est déposé dans le puits. Ce puits sera traité de la même manière que les puits d'échantillons dans les étapes de dosage ultérieures.
2. Retirer toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées du cadre et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
3. Diluer les échantillons, les étalons et les contrôles au 1/50e dans le tampon pour échantillon (solution verte). Exemple : 10 µl d'échantillon et 490 µl de tampon pour échantillon égale une dilution d'échantillon au 1/50e.
4. Ajouter 100 µl d'étalon (y compris le réactif à blanc/étalon 4), de contrôles et d'échantillon(s) patient dilués aux micropuits appropriés.
5. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et vider le liquide des échantillons. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
6. Laver 4 fois au SPTP. Chaque puits doit être rempli de SPTP à chaque lavage. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Tenir le cadre serré par le milieu de ses bords supérieur et inférieur afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer les résidus de liquide de lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
7. Ajouter 100 µl de conjugué anticorps anti-humain IgG/PR (solution bleue) aux puits correspondant aux étalons IgG, contrôles, réactif à blanc et échantillons patient. Ajouter 100 µl de conjugué anticorps anti-humain IgM/PR (solution rouge) aux puits correspondant aux étalons IgM, contrôles, réactif à blanc et échantillons patient.
8. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et vider les solutions conjuguées. Veiller à empêcher toute contamination croisée des solutions conjuguées d'anticorps anti-IgG et anti-IgM.
9. Laver 4 fois au SPTP ainsi que décrit à l'étape 7. Après le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et éponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
10. Ajouter 100 µl de solution substrat à un composant dans chaque puits et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Ajouter de la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
11. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution substrat incolore reste incolore. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur puits d'eau ou d'air à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm. La D.O. doit être mesurée dans les 5 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

RÉSULTATS

Étalonnage à point unique

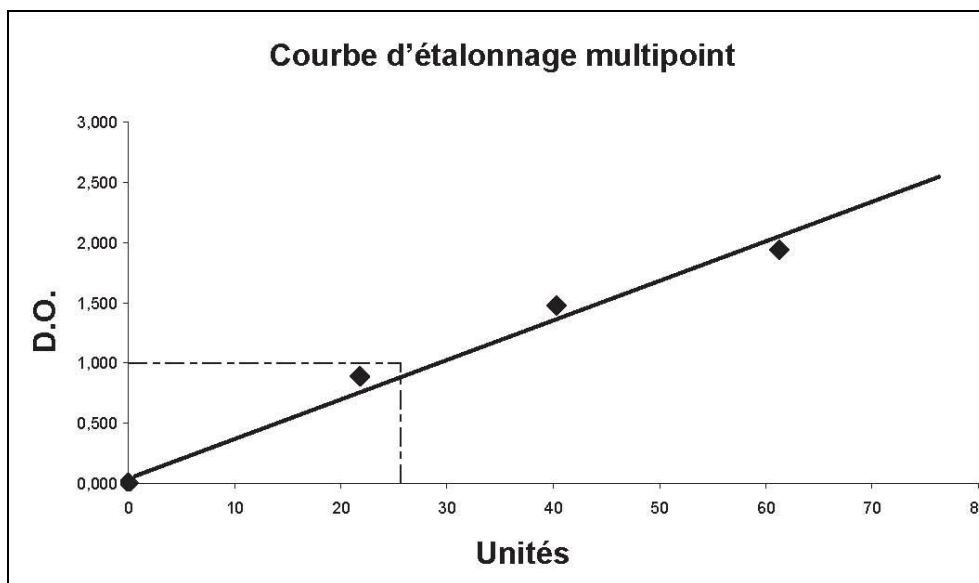
1. Calculer les D.O. moyennes si l'étalon 2, les contrôles et les échantillons patient ont été traités en double.
2. Pour calculer le facteur de conversion, diviser la concentration de l'étalon 2 imprimée sur l'étiquette du flacon par la D.O. ou la D.O. moyenne obtenue pour ce sérum étalon.
3. Multiplier la D.O. ou la D.O. moyenne de chacun des contrôles et des échantillons patient par le facteur de conversion approprié pour obtenir les concentrations en unités GPL ou MPL.

$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Concentration de l'étalon 2 en anticardiolipine (GPL ou MPL)}}{\text{Densité optique de l'étalon 2 (D.O. - G ou M)}}$ $\text{Concentration en anticardiolipine de l'échantillon} = \text{Facteur de conversion} \times \text{Densité optique (D.O.) de l'échantillon}$
--

4. Le facteur de conversion doit être calculé pour chacun des étalons à chaque dosage. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage ou interchanger les facteurs de conversion GPL ou MPL invaliderait les résultats.

Étalonnage par courbe multipoint

1. Calculer les D.O. moyennes si les étalons, les contrôles et les échantillons patient ont été traités en double.
2. Effectuer une analyse de régression linéaire ou une analyse de régression polynomiale quadratique/de 2ème ordre avec les quatre valeurs de calibre par rapport à la densité optique de chaque (O.D.) calibre. (Se référer aux unités GPL ou MPL des étiquettes des flacons ; l'étalon 4, tampon pour échantillon, est égal à 0 unité GPL ou MPL)
3. La courbe d'étalonnage peut être tracée automatiquement à l'aide d'un logiciel validé ou manuellement sur du papier graphique. Il est recommandé de construire la ligne de régression en utilisant l'intercept zéro afin d'éviter les valeurs négatives. Si cette option n'est pas disponible, toute valeur négative doit être rapportée en tant que valeur nulle. Pour établir la courbe manuelle, tracer la ligne optimale passant par les points placés en utilisant l'intercept zéro.
4. Déterminer les valeurs des contrôles et des échantillons patient à partir de la courbe d'étalonnage.
5. Exemple de courbe d'étalonnage multipoint.



Selon la courbe d'étalonnage donnée en exemple, une D.O. d'échantillon de 1,000 à 450 nm correspondrait à une valeur calculée de 26,2 unités. La courbe d'étalonnage n'est donnée qu'à titre d'exemple et ne doit pas être utilisée pour calculer des résultats de patients. Effectuer une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque lot de tests.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La D.O. de l'étalon 2 doit être d'au moins 0,600 pour valider le bon fonctionnement du kit. Une valeur inférieure à 0,600 indique que le kit est périmé.
2. La D.O. obtenue pour l'étalon 4, réactif à blanc, doit être inférieure à 0,050 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur un puits d'air ou d'eau. Une valeur supérieure à 0,050 peut indiquer que le réactif a été contaminé ou que la plaque a été mal lavée.
3. Les valeurs en anticardiolipine obtenues pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette indiquée sur les flacons. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Les valeurs de densité optique (si effectué) pour les doubles des contrôles ou des échantillons patient ne doivent pas différer de plus de 20 % de la valeur moyenne des échantillons dont les résultats de densité optique sont supérieurs à 0,200.
5. Chaque laboratoire doit confirmer régulièrement ses valeurs seuil normales de la population de patients appropriée. (Voir le chapitre Performance Characteristics, Clinical Specificity à titre d'exemple).
6. Les échantillons dont les valeurs d'anticardiolipine sont supérieures à 100 GPL ou 60 MPL peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 100 GPL ou 60 MPL ».
7. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

VALEURS NORMALES

Plage normale :

94 échantillons de sérum de donneurs sains ont donné les résultats suivants (moyenne + 2 écarts-type) :

- Moins de 23 GPL
- Moins de 11 MPL

PRÉVALENCE ATTENDUE

LES :

149 sérums provenant de patients avec LES ont été testés à l'aide du kit. 31 des échantillons (21 %) étaient positifs pour les anticorps IgG anticardiolipine. 15 des sérums (10 %) étaient positifs pour les anticorps IgM anticardiolipine. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les taux d'anticorps anticardiolipine et les taux d'anticorps anti-ADN bicaténaire ou l'activité de la maladie. Les anticorps monoclonaux spécifiques de l'ADN bicaténaire et de l'ADN simple brin ont également été testés. Aucune réaction avec la cardiolipine n'a été observée.

Autres maladies :

24 sérums de patients arthritiques ont été dosés. Un seul résultat était positif pour les anticorps aCL IgG. Aucun résultat n'était positif pour les anticorps aCL IgM.

93 sérums de patients atteints de sclérose systémique progressive (SSP) ont donné les résultats suivants : 12 des sérums (13 %) étaient positifs pour les aCL IgG et trois étaient positifs pour les aCL IgM.

La signification clinique des résultats positifs en cas de maladie autre que le LES est toujours en cours d'investigation.

LIMITES DU TEST

Les valeurs obtenues d'anticorps anticardiolipine constituent seulement une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Si le contexte clinique suggère la présence d'anticorps antiphospholipides et que le patient est négatif pour les anticorps anticardiolipine, certains auteurs recommandent le dosage des anticoagulants circulants pour confirmer le résultat négatif. Si un ou les deux tests pour un patient sont positifs, la présence d'anticorps antiphospholipides est confirmée.¹³

Des résultats positifs sans risque de thrombose peuvent être retrouvés chez des patients atteints de syphilis. Une étude portant sur 23 cas de syphilis confirmée a montré que 9 de ces patients (39 %) présentaient des résultats positifs avec le REAADS aCL. Si le contexte s'y prête, rechercher les anticorps antitréponèmes. Les anticorps anticardiolipine apparaissent de façon faible et transitoire dans beaucoup d'infections. Si le test d'un patient est d'abord positif alors qu'il présente des signes d'infection, le test doit être renouvelé après 6 mois.¹⁴

GARANTIE

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe au conditionnement. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis : téléphone 1-800-729-5661. Au dehors des États-Unis : téléphone 1-303-457-4345 ; télécopie 1-303-457-4519 ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

REAADs®**Equipo de determinación semicuantitativa de anticuerpos anticardiolipina IgG/IgM****Para uso diagnóstico *in vitro***

Un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgG e IgM anticardiolipina (aCL) en suero o plasma humano.

INDICACIONES

Para la detección y semicuantificación de anticuerpos anticardiolipina en individuos con lupus eritematoso diseminado (LED) y enfermedades seudolúpicas (síndrome antifosfolípido).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se utiliza como un ELISA indirecto. Se incuban muestras de suero diluidas, sueros calibradores y controles en micropocillos recubiertos con cardiolipina, permitiendo que los anticuerpos aCL presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Tras la eliminación, mediante lavado, de las proteínas del suero no unidas, se añaden anticuerpos específicos para IgG o IgM humanas marcados con peroxidasa (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos a la cardiolipina. Se suministran dos soluciones de anticuerpos conjugados a enzimas: una específica para anticuerpos IgG humanos y otra específica para anticuerpos IgM humanos. La concentración de los anticuerpos aCL IgG y la de los anticuerpos aCL IgM deben determinarse por separado. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado de enzima unida al anticuerpo se analiza añadiendo tetrametilbencidina y agua oxigenada (H₂O₂) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos aCL.

Los resultados se obtienen leyendo la D.O. (densidad óptica o absorbancia) de cada pocillo en un espectrofotómetro. Se suministran sueros calibradores con las concentraciones de anticuerpos aCL IgG e IgM expresadas en unidades GPL o MPL, respectivamente. Estas unidades están homologadas con las preparaciones reconocidas internacionalmente del Phospholipid Standardization Laboratory, Universidad de Louisville. El usuario tiene la opción de usar un calibrador de un solo punto o una curva de calibración de cuatro puntos. En la calibración de un solo punto, para obtener un factor de conversión (uno para aCL IgG y otro para aCL IgM), divide el valor de la concentración de los sueros del calibrador por el valor de la D.O. del suero calibrador. Los valores de la D.O. de todas las demás muestras se multiplican por los valores de conversión para obtener la concentración de anticuerpos aCL IgG e IgM en unidades estándar. Una unidad GPL equivale a 1 µg/ml de una muestra de IgG estándar purificada por afinidad, y una unidad MPL equivale a 1 µg/ml de una muestra de IgM estándar purificada por afinidad.¹² Para la calibración multipuntual, realice un análisis de regresión lineal con los valores de los calibradores respecto a las D.O. de los calibradores.

REACTIVOS

Consérvelos entre 2 y 8 °C. No los congele.

Cada equipo de determinación de anticardiolipina REAADs de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos **(los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo)**:

- 96 micropocillos recubiertos de cardiolipina de corazón de bovino estabilizada (difosfatidil glicerol) (12 tiras de 8 pocillos divisibles), con marco (Antigen Coated Microwells).
- 1 botella (60 ml) de diluyente de muestras* (solución verde); contiene suero bovino de ternero (Sample Diluent).
- 3 frascos (0,250 ml) de sueros calibradores* de aCL IgG (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humanos); la etiqueta del frasco especifica la concentración de anticuerpo en unidades GPL. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto (aCL IgG Calibrator 1, aCL IgG Calibrator 2, aCL IgG Calibrator 2).
- 3 frascos (0,250 ml) de sueros calibradores* aCL IgM (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humano); la etiqueta del frasco especifica la concentración de anticuerpo en unidades MPL.* Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto (aCL IgM Calibrator 1, aCL IgM Calibrator 2, aCL IgM Calibrator 3).
- 1 frasco (0,250 ml) de suero aCL IgG de control positivo* (humano). Véase el intervalo GPL esperado en la etiqueta del frasco (aCL IgG Positive Control).
- 1 frasco (0,250 ml) de suero aCL IgM de control positivo* (humano). Véase el intervalo MPL esperado en la etiqueta del frasco (aCL IgM Positive Control).

- 1 frasco (0,250 ml) de suero aCL de control normal* (humano). Véase el intervalo GPL y MPL esperado en la etiqueta del frasco (aCL IgG/IgM Normal Control).
- 1 botella (15 ml) de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgG humana (de cabra) y HRP (solución azul) (aCL IgG HRP-Conjugated Antibody).
- 1 botella (15 ml) de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana (de cabra) y HRP (solución roja) (aCL IgM HRP-Conjugated Antibody).
- 1 botella (15 ml) de sustrato de un componente (TMB y H₂O₂); listo para su uso (One-component Substrate).
- 1 botella (15 ml) de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) (Stopping Solution).
- 2 botellas (30 ml) de concentrado para lavado (solución buffer de fosfato (PBS) 33x) (Wash Concentrate).

***PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*

1. El material de origen humano empleado para preparar los calibradores y los controles incluidos con este equipo se ha examinado y resultó negativo en las pruebas de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg), de la hepatitis C (HCV) y de los VIH 1 y 2 requeridas por la FDA. Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables al manipular los reactivos del equipo y lávese las manos minuciosamente después de su uso.
5. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como conservante. Se ha observado que la azida sódica forma azidas de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas metálicas son explosivas. Todas las soluciones que contengan azida deben lavarse bien con abundante agua para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en el sistema de tuberías.
6. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:

Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).

Advertencia . Rischio biologico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El suero es la muestra recomendada. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación una vez formados los coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2 y 8 °C. Si es necesario conservar las muestras durante más de 72 horas, deben congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida. No utilice suero o plasma hemolizado, ictérico o lipémico, ya que puede producir resultados erróneos. Las muestras que contengan partículas visibles deben aclararse mediante centrifugación antes de analizarse.

Puede utilizarse plasma obtenido con la mayoría de los anticoagulantes, excepto con heparina. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el plasma debe separarse inmediatamente de las células mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante debe extraerse cuidadosamente tras la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas. Se recomienda repetir los pasos de centrifugación y separación para minimizar la contaminación con plaquetas. Los trombocitos disueltos o deteriorados por el tiempo pueden reaccionar con los anticuerpos antifosfolípido y producir resultados erróneos. Si no se van a analizar inmediatamente, las muestras de plasma deben almacenarse como se ha descrito para el caso del suero.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos:

Prueba de anticardiolipina REAADS; véase una lista completa en «Reactivos».

Materiales necesarios pero no provistos:

- Agua destilada para preparar una solución de lavado PBS y para poner a cero o borrar la lectura de la placa final del análisis
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 µl, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado
- Guantes desechables
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de dispensar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de suero y los reactivos del equipo se equilibren a temperatura ambiente (18-26 °C) y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Todas las muestras y reactivos no utilizados deben volver a refrigerarse lo antes posible.
2. Todas las diluciones del calibrador, los controles y los sueros problema deben realizarse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada proceso puede incluirse un pocillo testigo de agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua destilada al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse a cero o a borrarse con respecto a un pocillo de aire o agua.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión hacia el fondo de los micropocillos apretando una botella de plástico de punta. La solución de lavado en el pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automático de microplacas.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes a todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todos los calibradores, controles y muestras deben aplicarse en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este periodo de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice Tween 20 ni otros detergentes en este ensayo.
13. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
14. No utilice componentes del equipo provenientes de equipos con diferentes números de lote.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Solución de lavado (PBS): Mida 30 ml de concentrado para lavado (PBS 33x) y dilúyalos en agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución PBS no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.

Procedimiento del ensayo

1. El ensayo puede realizarse con una calibración de un solo punto (calibrador 2) o una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3 más el diluyente de muestras o el reactivo testigo como calibrador 4 igual a 0 unidades GPL o 0 unidades MPL). Se debe realizar un control con reactivo testigo para cada conjugado, IgG e IgM tanto con el método de calibración de un solo punto como con el método multipuntual; se añade diluyente de muestras sin suero al pocillo. Este pocillo se tratará de la misma forma que los pocillos control en los siguientes pasos del ensayo.
2. Retire del marco las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
3. Prepare una dilución 1:50 de los calibradores, controles y muestras de pacientes en el diluyente de muestras (solución verde); por ejemplo, 10 µl de muestra añadidos a 490 µl de diluyente de muestras es igual a una dilución de muestra de 1:50.
4. Añada 100 µl de calibradores (incluidos el reactivo testigo y el calibrador 4), controles y muestras de pacientes diluidos a los micropocillos correspondientes.
5. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe el líquido de muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
6. Lave 4 veces con PBS. Cada pocillo debe llenarse con PBS en cada uno de los lavados. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. El marco debe presionarse en el centro por la parte superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Seque con papel secante para retirar los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
7. Añada 100 µl de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgG humana y HRP (azul) a los pocillos correspondientes al calibrador, los controles, el reactivo testigo y las muestras de pacientes de IgG. Añada 100 µl de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgM humana y HRP (roja) a los pocillos correspondientes al calibrador, los controles, el reactivo testigo y las muestras de pacientes de IgM.
8. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe las soluciones conjugadas. Tenga cuidado para no permitir la contaminación cruzada de soluciones conjugadas de anticuerpos anti-IgG y anti-IgM.
9. Lave 4 veces con PBS como en el paso 7. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
10. Añada 100 µl de solución de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada solución de sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
11. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y al mismo ritmo con el que se añadió el sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y el sustrato incoloro permanecerá igual. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto a un pocillo testigo de aire o agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm. Los valores de la D.O. deben leerse durante los 5 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

RESULTADOS

Calibración de un solo punto

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados del calibrador 2, los controles y las muestras de pacientes.
2. Para obtener el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero calibrador 2 (especificada en la etiqueta del frasco) por la D.O. o la media de la D.O. del suero calibrador.
3. Para obtener un valor de concentración en unidades GPL o MPL, multiplique la D.O. o la media de la D.O. de cada uno de los controles y de las muestras de pacientes por el factor de conversión apropiado.

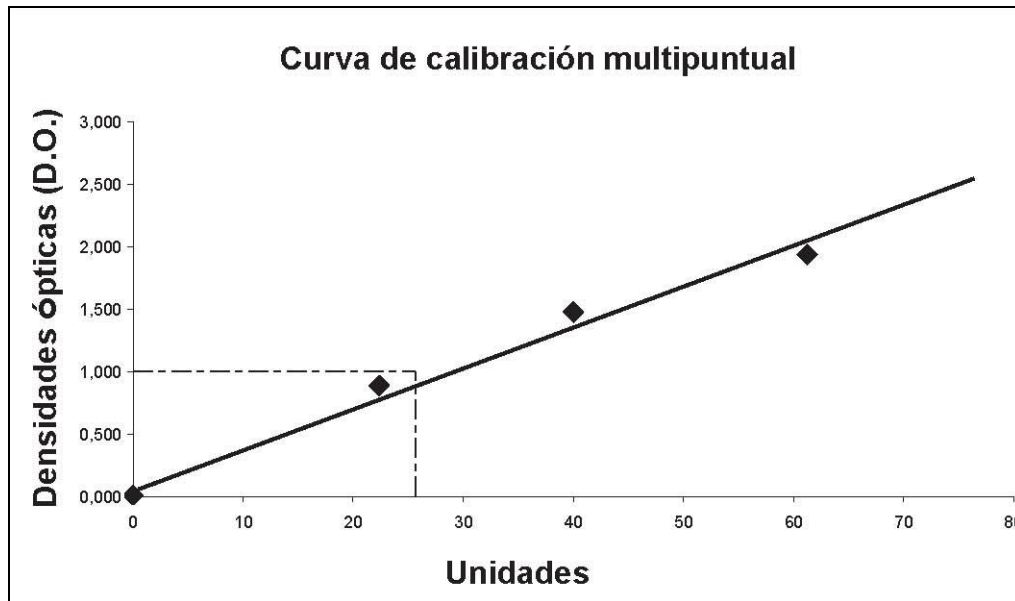
$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Concentración de anticardiolipina del calibrador 2 (GPL o MPL)}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 2 (D.O. - G o M)}}$$
$$\text{Concentración de anticardiolipina de la muestra} = \text{factor de conversión} \times \text{absorbancia de la muestra (D.O.)}$$

4. El valor de conversión debe calcularse para los dos calibradores en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo o se intercambian los factores de conversión de GPL o MPL, los resultados obtenidos no serán válidos.

Calibración de la curva multipuntual

1. Calcule los valores medios de la D.O. si se hicieron duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión lineal o de regresión polinómica cuadrática/de 2º orden con los cuatro valores del calibrador frente a la densidad óptica (O.D.) para cada calibrador. (la etiqueta del frasco especifica las unidades GPL y MPL. (El calibrador 4 [diluyente de muestras] es igual a 0 unidades GPL o 0 unidades MPL)

3. La curva del calibrador puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas. Para evitar los valores negativos, se recomienda utilizar una intersección en cero al generar la línea de regresión. Si no se dispone de esta opción, los valores negativos se indicarán como ceros. Cuando se genera la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados utilizando una intersección de cero.
4. Determine los valores de las muestras del paciente y del control a partir de la curva del calibrador.
5. Ejemplo de calibración con curva multipuntual.



Usando la curva de calibración suministrada, la D.O. de una muestra de 1,000 a 450 nm correspondería a un valor calculado de 26,2 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo y no debe usarse para calcular los resultados del paciente. Debe realizarse una nueva curva de calibración con cada proceso de prueba.

CONTROL DE CALIDAD

1. El valor de la D.O. del calibrador 2 debe ser 0,600 como mínimo para garantizar que el equipo funcione adecuadamente. Las lecturas de D.O. del calibrador 2 inferiores a 0,600 pueden indicar que el equipo ya no está en condiciones de utilizarse.
2. La D.O. del calibrador 4 o del reactivo testigo debe ser inferior a 0,050 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto a aire o a un pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,050 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
3. Los valores de anticardiolipina obtenidos con los sueros de control deben estar dentro de los límites indicados en las etiquetas del envase. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Si se procesan duplicados de los controles y las muestras de los pacientes, sus valores de D.O. deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios valores umbral para la población de pacientes correspondiente. Como ejemplo, véase Performance Characteristics, Clinical Specificity.
6. Las muestras con valores de anticardiolipina de más de 100 GPL o 60 MPL pueden especificarse como «más de 100 GPL o 60 MPL».
7. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase «Control de calidad») antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

VALORES ESPERADOS

Rango normal:

Se analizaron las muestras de suero de 94 donantes de sangre sanos y se estableció el siguiente rango normal (media +2 desviaciones estándar):

- Menos de 23 GPL
- Menos de 11 MPL

PREVALENCIA ESPERADA

LED:

Se utilizó el equipo para analizar muestras de suero de 149 pacientes con LED. En 31 casos (21 %) se obtuvieron resultados positivos para los anticuerpos IgG anticardiolipina. En 15 casos (10 %) se obtuvieron resultados positivos para los anticuerpos IgM anticardiolipina. No se encontró ninguna correlación entre los niveles de anticuerpos anticardiolipina y los niveles de anticuerpos anti-dsADN o la actividad de la enfermedad. Con este ensayo se analizaron también anticuerpos monoclonales específicos contra dsADN y ssADN, y no se encontró reactividad con los micropocillos recubiertos de cardiolipina.

Otros estados de enfermedad:

Se analizaron con este ensayo 24 muestras de suero de pacientes con osteoartritis (OA). Sólo una de estas muestras resultó positiva para los anticuerpos aCL IgG. Ninguna fue positiva para los anticuerpos aCL IgM.

Se analizaron con este ensayo 93 muestras de suero de pacientes con esclerosis sistémica progresiva (ESP). Doce de ellas (13 %) resultaron positivas para aCL IgG y tres (3 %) para los anticuerpos aCL IgM.

La importancia clínica de los resultados positivos en estados de enfermedad distintos del LED aún está investigándose.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las concentraciones de anticuerpos anticardiolipina obtenidas en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Si los hallazgos clínicos indican la presencia de anticuerpos antifosfolípido y el paciente resulta negativo para los anticuerpos anticardiolipina, algunos investigadores recomiendan analizar la presencia del anticoagulante lúpico para confirmar el resultado negativo. Un paciente se considera positivo para los anticuerpos antifosfolípido si obtiene resultados positivos en uno o en ambos ensayos.¹³

Los pacientes con infecciones sífilíticas actuales o previas pueden producir resultados positivos en el ensayo de aCL REAADS sin que exista un mayor riesgo de trombosis. En un estudio realizado en 23 pacientes con sífilis confirmada (positivos para anticuerpos FTA-Abs), 9 (39 %) resultaron positivos en el ensayo de aCL REAADS. Si el historial del paciente indica un diagnóstico de infección sífilítica, esto deberá confirmarse o descartarse mediante un ensayo específico contra anticuerpos antitreponémicos. Los anticuerpos anticardiolipina pueden aparecer transitoriamente a niveles bajos durante un gran número de infecciones. Si el primer ensayo de un paciente es positivo cuando existen signos clínicos de infección, el ensayo deberá repetirse después de un intervalo de 6 meses.¹⁴

GARANTÍA

Se garantiza que este producto funcionará según se describe en este prospecto. Corgenix, Inc. desautoriza cualquier garantía implícita de comerciabilidad o aptitud para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. se hará responsable de daños emergentes.

Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al +1 800-729-5661. Fuera de los EE.UU., llame al +1-303-457-4345, envíe un fax al +1-303-457-4519 o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

REAADS®

Kit per il dosaggio semiquantitativo delle IgG/IgM anti-cardiolipina

Per uso diagnostico *in vitro*

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG e IgM anti-cardiolipina nel siero o nel plasma umano.

USO PREVISTO

L'individuazione e la determinazione semiquantitativa di anticorpi anti-cardiolipina nei soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) e da disturbi di tipo lupus (sindrome da antifosfolipidi).

PRINCIPIO DEL TEST

L'analisi va eseguita come un test immunoenzimatico ELISA indiretto. I campioni di siero diluiti, i sieri di calibrazione ed i controlli vengono incubati nei pozzetti rivestiti di cardiolipina in modo che gli anticorpi aCL presenti nei campioni reagiscano con l'antigene immobilizzato. Dopo l'allontanamento per lavaggio delle proteine sieriche libere, vengono aggiunti anticorpi specifici per IgG o IgM umane marcati con perossidasi di rafano (HRP) in modo da formare complessi con gli anticorpi legati alla cardiolipina. Vengono fornite due soluzioni di anticorpi coniugati ad enzimi, uno specifico per gli anticorpi IgG umani e uno specifico per gli anticorpi IgM umani. Le concentrazioni di anticorpi IgG aCL e IgM aCL vanno determinate separatamente. Dopo un ulteriore lavaggio, il coniugato enzima-anticorpo legato viene misurato mediante aggiunta di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H₂O₂) come substrato cromogeno. Il colore si sviluppa nei pozzetti ad una intensità proporzionale alla concentrazione di anticorpi aCL nel siero.

I risultati si ottengono leggendo mediante spettrofotometro la densità ottica (o assorbanza) di ciascun pozzetto. I sieri di calibrazione vengono forniti con le concentrazioni di IgG aCL e IgM aCL espresse rispettivamente in unità GPL o MPL. Queste unità sono riconducibili alle preparazioni standard del Phospholipid Standardization Laboratory, University of Louisville. L'utente può usare un calibratore a punto singolo o una curva di calibrazione a quattro punti. Per la calibrazione a punto singolo, dividendo il valore della concentrazione dei sieri di calibrazione per il valore di densità ottica del calibratore si ottiene un fattore di conversione (uno per le IgG aCL e uno per le IgM aCL). I valori di densità ottica di tutti gli altri campioni vengono moltiplicati per il fattore di conversione per ottenere le concentrazioni di anticorpi IgG e IgM aCL espresse in unità standard. Una unità GPL equivale ad 1 µg/ml di un campione IgG standard purificato per affinità, e una unità MPL equivale ad 1 µg/ml di un campione IgM standard purificato per affinità.¹² Per la calibrazione a più punti, eseguire l'analisi di regressione lineare con i valori dei calibratori in funzione dei valori di densità ottica dei calibratori. I risultati del controllo e del campione del paziente sono determinati dalla curva di calibrazione.

REAGENTI

Conservare a 2-8 °C. Non congelare.

Ciascun kit REAADS per il dosaggio della anti-cardiolipina a 96 pozzetti contiene i seguenti reagenti **(i volumi possono variare a seconda delle dimensioni e della configurazione del kit)**.

- 96 pozzetti rivestiti di cardiolipina (difosfatidilglicerolo) stabilizzata di cuore di bovino (12 strisce da 8 pozzetti), con bordo (Antigen Coated Microwells).
- 1 flacone (60 ml) di diluente per campioni* (soluzione verde); contiene siero di vitello (Sample Diluent).
- 3 fiale (0,250 ml) di sieri di calibrazione* IgG aCL umane (1 alto, 2 medio, 3 basso); vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi in unità GPL. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo (aCL IgG Calibrator 1, aCL IgG Calibrator 2, aCL IgG Calibrator 3).
- 3 fiale (0,250 ml) di sieri di calibrazione* IgM aCL umane (1 alto, 2 moderato, 3 basso); vedere l'etichetta sulla fiala per la concentrazione di anticorpi in unità MPL. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo (aCL IgM Calibrator 1, aCL IgM Calibrator 2, aCL IgM Calibrator 3).
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo positivo* IgG aCL umano; vedere l'etichetta sulla fiala per l'intervallo GPL atteso (aCL IgG Positive Control).

- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo positivo* IgM aCL umano; vedere l'etichetta sulla fiala per l'intervallo MPL atteso (aCL IgM Positive Control).
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo normale* aCL umano; vedere l'etichetta sulla fiala per gli intervalli GPL e MPL attesi (aCL IgG/IgM Normal Control).
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di anticorpi ovini anti-IgG umana coniugati con HRP (soluzione blu) (aCL IgG HRP-Conjugated Antibody).
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di anticorpi ovini anti-IgM umana coniugati con HRP (soluzione rossa) (aCL IgM HRP-Conjugated Antibody).
- 1 flacone (15 ml) di substrato monocomponente (TMB e H₂O₂); pronto per l'uso (One-component Substrate).
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) (Stopping Solution).
- 2 flaconi (30 ml) di concentrato di lavaggio (33X PBS) (Wash concentrate).

***ATTENZIONE: contiene sodio azide**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*

1. Il materiale di origine umana usato per la preparazione dei calibratori e dei controlli inclusi in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti della FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV 1 e 2. Tuttavia, tutti gli emoderivati di origine umana, inclusi i campioni da pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante. È stato riportato che il sodio azide può formare azidi di rame e di piombo quando viene lasciato a contatto con questi metalli. Tali composti azidici sono esplosivi. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere sciacquate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
6. Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46).

Avvertimento . Rischio biologico .

ACQUISIZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero è la matrice preferita. Il sangue va raccolto per venipuntura ed il siero va separato dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione dopo la coagulazione. Se non vengono analizzati immediatamente, i campioni vanno conservati a 2-8 °C. Se devono essere conservati per più di 72 ore, i campioni vanno congelati a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non usare siero o plasma emolizzati, itterici o lipemici, poiché queste condizioni possono produrre risultati errati. Campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima del test.

Il plasma prelevato con la maggior parte degli anticoagulanti (ad eccezione dell'eparina), può essere utilizzato. Prelevare il sangue per venipuntura e separare immediatamente il plasma dalla parte cellulare del sangue centrifugando a 1500 g per 10 minuti. Il sangue va raccolto per venipuntura ed il plasma separato dalle cellule per centrifugazione. Il soprannatante va tolto con grande attenzione dopo centrifugazione per evitare contaminazione con le piastrine. Si consiglia di ripetere più di una volta i procedimenti di centrifugazione e separazione onde minimizzare la contaminazione da piastrine. Piastrine vecchie o lisate possono reagire con gli anticorpi antifosfolipidi e generare risultati errati. Se non vengono analizzati immediatamente, i campioni di plasma devono essere conservati analogamente a quelli di siero.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit REAADS per il dosaggio dell'anti-cardiolipina; per un elenco completo, vedere la sezione "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata per preparare la soluzione di lavaggio PBS e per tarare o azzerare il lettore della piastra nella fase finale del dosaggio
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di misurare tra 5 e 1000 µl con punte appropriate.
- Vetreria assortita adatta a manipolare piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con la punta leggermente indietro per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico.
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbanza a 450 nm (possibilmente con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanali per versare in 8 pozzetti simultaneamente.

Note procedurali

1. Portare i campioni di siero e i reagenti del kit a temperatura ambiente (18-26 °C) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Rimettere al più presto in frigorifero tutti i campioni ed i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni dei calibratori, dei controlli e dei test vanno eseguite solo immediatamente prima del test.
3. In ciascuna sessione di analisi, su ogni piastra, è possibile analizzare un singolo pozzetto bianco. In questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungere invece 200 µl di acqua distillata al pozzetto immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Il lettore di piastre va programmato su "zero" o azzerato contro l'aria o contro un pozzetto bianco.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato, dirigere nel fondo dei micropozzetti un forte getto di soluzione di lavaggio erogato da un flacone di plastica morbida con punta larga. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferirà con la procedura. È anche possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatico per piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - Eventuali residui di PBS possono causare un sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale che possa versare in 8 pozzetti simultaneamente. Ciò aumenta la velocità dal test e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. È pertanto di fondamentale importanza rispettare attentamente i tempi previsti per ciascun passaggio. Tutti i calibratori, i controlli e i campioni vanno aggiunti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve essere maggiore dalla quantità che può essere aggiunta entro questi minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia quando è terminata l'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione superiori o inferiori alla temperatura ambiente (18-26 °C) possono dar luogo ad artefatti.
11. Quando si aprono le fiale originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Non utilizzare detergenti del tipo Tween 20 o altri.
13. Non utilizzare componenti dal kit che abbiano superato la data di scadenza.
14. Non utilizzare componenti di kit da differenti lotti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di lavaggio (PBS): Misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (33X PBS) e diluirlo a 1 l con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS inutilizzata in frigorifero a 2-8 °C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione crociata o batterica.

Procedura di dosaggio

1. L'analisi può essere eseguita con una calibrazione a punto singolo (calibratore 2) o una curva di calibrazione a quattro punti (calibratori 1, 2 e 3 più diluente per campione/bianco reagente come calibratore 4 pari a 0 unità GPL o 0 unità MPL). Un bianco reagente di controllo va analizzato per ciascun coniugato, IgG e IgM, sia con il metodo di calibrazione a punto singolo, sia con il metodo di calibrazione a più punti; dispensare nel pozzetto il diluente per campione senza siero. Questo pozzetto sarà trattato come i pozzetti dei campioni in tutte le fasi successive del test.
2. Togliere dall'apposito telaio tutte le strisce di pozzetti che non verranno usate, e conservarle nella sacca in dotazione.
3. Preparare una diluizione 1:50 dei calibratori, dei controlli e dei campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione (soluzione verde); ad esempio: 10 µl di campione aggiunti a 490 µl di diluente per campione equivalgono ad una diluizione del campione pari a 1:50.
4. Aggiungere 100 µl di calibratori diluiti (incluso il bianco reagente/calibratore 4), i controlli e i campioni da pazienti ai pozzetti appropriati.
5. Far incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti ed eliminare la soluzione di campione. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i campioni.
6. Lavare 4 volte con PBS. Ciascun pozzetto deve essere riempito con PBS per lavaggio. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro e svuotare il liquido. Con un movimento deciso del polso scuotere il liquido nei pozzetti causandone la fuoriuscita. Il telaio dei pozzetti va schiacciato al centro in alto e in basso per trattenere i pozzetti durante il lavaggio. Asciugare le ultime gocce di liquido con carta assorbente. Evitare che i pozzetti si asciughino tra le varie fasi.
7. Aggiungere 100 µl di soluzione di anticorpi anti-IgG umane coniugati con HRP (blu) ai pozzetti corrispondenti al calibratore IgG, ai controlli, al bianco reagente e ai campioni prelevati dal paziente. Aggiungere 100 µl di soluzione di anticorpi anti-IgM umane coniugati con HRP (rossa) ai pozzetti corrispondenti al calibratore IgM, ai controlli, al bianco reagente e ai campioni prelevati dal paziente.
8. Far incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti ed eliminare le soluzioni di coniugato. Evitare la contaminazione crociata delle soluzioni di coniugato di anticorpi anti-IgG e anti-IgM.
9. Lavare 4 volte con PBS come indicato al passaggio 7. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare che i pozzetti si asciughino.
10. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato monocomponente a ciascun pozzetto e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere il substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si svilupperà un colore blu.
11. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (0,36 acido solforico N) a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità in cui si è precedentemente aggiunto il substrato. La soluzione blu di substrato diventa gialla, mentre il substrato incolore rimane tale. Azzerare il lettore di piastre contro l'aria o contro il pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm. I valori di densità ottica devono essere misurati entro 5 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

RISULTATI

Calibrazione a punto singolo

1. Se si sono analizzati il calibratore 2, i controlli e i campioni in duplicato, calcolare i valori medi di densità ottica.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione calibratore 2 (stampato sull'etichetta della fiala) per il valore di densità ottica o per il valore medio di densità ottica del siero di calibrazione.
3. Per ottenere un valore di concentrazione in unità GPL o MPL, moltiplicare il valore di densità ottica o il valore medio di densità ottica di ciascun controllo e campione del paziente per il fattore di conversione appropriato.

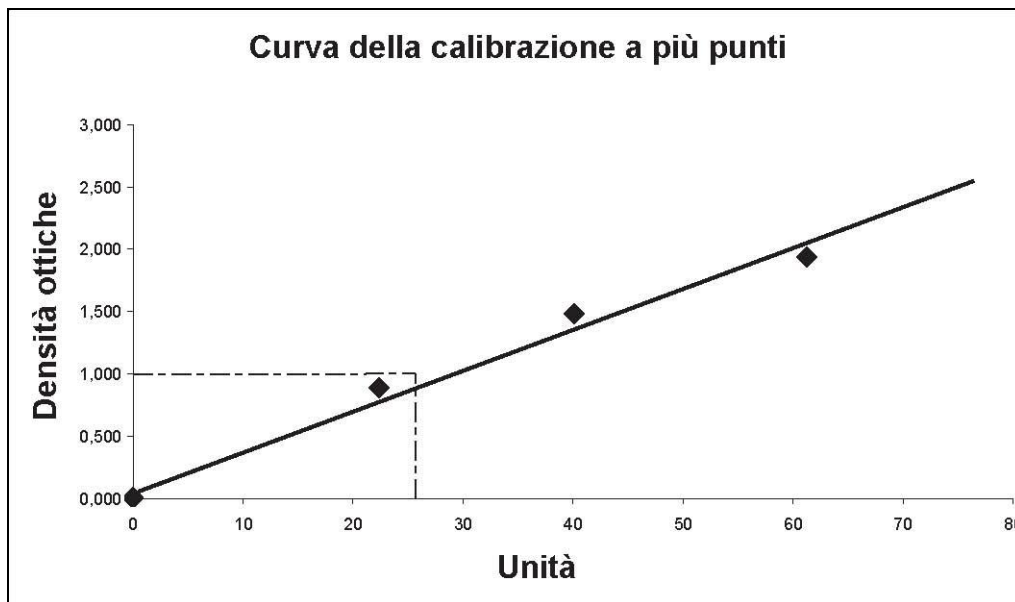
$$\text{Fatt. convers.} = \frac{\text{Conc. di anti-cardiolipina del calibratore 2 (GPL o MPL)}}{\text{Valore di assorbanza del calibratore 2 (densità ottica - G o M)}}$$

$$\text{Conc. di anti-cardiolipina nel campione} = \text{Fatt. convers.} \times \text{Assorbanza del campione (densità ottica)}$$

4. Il fattore di conversione va calcolato per entrambi i calibratori in ogni test. L'uso di un fattore di conversione da un altro dosaggio, o lo scambio dei fattori di conversione da GPL a MPL, generano risultati non validi.

Calibrazione con curva a più punti

1. Se si sono analizzati i calibratori, i controlli e il campione in duplicato, calcolare le densità ottiche medie.
2. Eseguire un'analisi della regressione lineare o un'analisi di regressione polinomiale di secondo ordine con i quattro valori del calibratori rispetto alle O.D. medie per ciascun calibratore. (Per le unità GPL o MPL, vedere le etichette delle fiale; il calibratore 4, diluente per campione, equivale a 0 unità GPL o 0 MPL)
3. La curva del calibratore può essere tracciata automaticamente usando un software convalidato o manualmente su carta millimetrata. Per evitare di ottenere valori negativi, si raccomanda di usare un'intercetta zero quando si genera la linea di regressione. Se questa opzione non è disponibile, gli eventuali valori negativi vanno riportati come unità zero. Per la generazione manuale della curva, congiungere con la linea più idonea i punti tracciati usando un'intercetta zero.
4. Determinare i valori del siero di controllo e del campione da paziente dalla curva del calibratore.
5. Esempio di una curva di calibrazione a più punti.



Usando la curva di calibrazione esemplificativa fornita, una densità ottica del campione pari a 1,000 a 450 nm corrisponderebbe a un valore calcolato pari a 26,2 unità. La curva di calibrazione è fornita esclusivamente a scopo esemplificativo e non va usata per calcolare i risultati dei pazienti. Una nuova curva di calibrazione va ottenuta con l'esecuzione di ciascuna analisi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Il valore di densità ottica del calibratore 2 deve essere almeno 0,600 per garantire il corretto funzionamento del kit. Valori di densità ottica del calibratore 2 inferiori a 0,600 possono indicare che il kit non è più valido.
2. Dopo la calibrazione dello spettrofotometro sull'aria o sul pozzetto bianco, la densità ottica del calibratore 4 o del bianco reagente deve essere inferiore a 0,050. Valori più alti di 0,050 possono indicare una possibile contaminazione del reagente o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori di anti-cardiolipina ottenuti per i sieri di controllo devono essere compresi negli intervalli indicati sulle etichette dei contenitori. Ma piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi intervalli sono accettabili.
4. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati da pazienti (se analizzati) devono rimanere entro il 20% della densità ottica media per i campioni che hanno valori di assorbanza maggiori di 0,200.
5. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare i propri valori di cut-off per una determinata popolazione di pazienti. Per esempio, vedere Performance Characteristics, Clinical Specificity.
6. I campioni con valori di anti-cardiolipina superiori a 100 GPL o 60 MPL possono essere riportati come "superiori a 100 GPL o 60 MPL".
7. Assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità (vedere Controllo di qualità) prima di riportare i risultati del test.

VALORI ATTESI

Range di riferimento:

Sono stati analizzati campioni di siero da 94 donatori di sangue sani ottenendo il seguente range di normalità (media + 2 DS):

- meno di 23 GPL
- meno di 11 MPL

PREVALENZE PREVISTE

LES

I campioni di siero ottenuti da 149 soggetti affetti da LES sono stati analizzati con il kit. Trentuno campioni (21%) sono risultati positivi per gli anticorpi IgG anti-cardiolipina. Quindici campioni (10%) sono risultati positivi per gli anticorpi IgM anti-cardiolipina. Non si è trovata alcuna correlazione tra i livelli di anticorpi anti-cardiolipina e i livelli di anticorpi anti-dsDNA o l'attività della malattia. Anticorpi monoclonali specifici per dsDNA e ssDNA sono stati anche saggiati in questo test e sono risultati non reattivi nei pozzetti rivestiti di cardiolipina.

Altre condizioni patologiche

Sono stati inoltre saggiati 24 campioni di siero da pazienti affetti da osteoartrite (OA). Solamente uno di essi è risultato positivo per gli anticorpi IgG aCL. Nessuno era positivo per gli anticorpi IgM aCL.

Si sono inoltre analizzati novantatré campioni di siero prelevati da pazienti affetti da sclerosi sistemica progressiva (PSS). Dodici dei campioni (13%) sono risultati positivi per IgG aCL e tre sono risultati positivi per IgM aCL.

L'importanza clinica dei risultati positivi nelle condizioni patologiche diverse dal LES è ancora in fase di indagine.

LIMITI DEL TEST

Le concentrazioni di anticorpi IgG aCL e IgM aCL ottenute con questo dosaggio sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare risultati in funzione dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altri procedimenti diagnostici. Se i risultati clinici suggeriscono la presenza di anticorpi antifosfolipidi mentre il paziente è negativo per gli anticorpi anti-cardiolipina, alcuni ricercatori suggeriscono, per confermare il risultato negativo, di rilevare l'eventuale presenza di lupus anticoagulante. Un paziente va considerato positivo per gli anticorpi antifosfolipidi se uno o entrambi i test sono positivi.¹³

Pazienti attualmente o precedentemente affetti da sifilide possono dare risultati positivi nel test REAADS aCL senza aumentato rischio di trombosi. In uno studio su 23 pazienti con sifilide in atto (positivi per FTA-Abs), nove campioni (39%) sono risultati positivi nel test REAADS aCL. Se l'anamnesi del paziente indica una possibile diagnosi di infezione sifilitica, è necessario confermarla o escluderla mediante un test specifico per anticorpi antitreponema. Bassi livelli di anticorpi anti-cardiolipina possono presentarsi in maniera transitoria simultaneamente a molte infezioni. Se un paziente risulta positivo ad un primo test mentre esistono segni clinici di infezione, il test va ripetuto sei mesi dopo.¹⁴

GARANZIA













Si garantisce l'efficacia di questo prodotto secondo la descrizione fornita nel foglietto illustrativo. Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia di commerciabilità o idoneità a scopi particolari, e in nessuna circostanza Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per richiedere l'assistenza tecnica o mettersi in contatto con il servizio di assistenza clienti negli Stati Uniti, dall'interno degli Stati Uniti chiamare il numero +1-800-729-5661. Fuori dagli Stati Uniti, chiamare il numero +1-303 457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519, o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. McNiel HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49:193-280.
2. Harris EN. Annotation. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 74:1-9.
3. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990; 112:682-698.
4. Sammaritano LR, Gharavi AE, Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome: immunologic and clinical aspects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1990; 20:81-96.
5. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome (Editorial). *J Rheumatol* 1986; 13:486-489.
6. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342:341-344.
7. Wilson, WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-1311.
8. Loizou S, McCrean JD, Rudge AC, et al. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62:738-745.
9. Triplett DA. Assays for detection of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1994; 3:281-287.
10. Schick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976; 57:1221-1226.
11. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 42:63-75.
12. Wilson WA, Faghiri Z, Taheri F, Gharavi AE. Significance of IgA antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1998; 7:Suppl 2, S110-S113.
13. Bick RL, Baker WF. Antiphospholipid syndrome and thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1999; 25: 333-350.
14. Barna LK, Triplett DA, Foster WM, Gaddis ML. A study of relationships among anti-phosphatidylserine and anticardiolipin antibodies, the lupus anticoagulant and clinical complications. *Lupus* 1994; 3:357.
15. Keedy K, Santos M, Lopez L. Prevalence of antibodies to anti-phosphatidylserine in autoimmune diseases. *Lupus* 1994; 3:344.
16. Keedy K, Santos M, Lopez L. Prevalence and clinical significance of anti-phosphatidylserine antibodies. *Arthritis Rheum* 1994; 37:S392.
17. Jansen NL, Snell JR, Moy JN. Myocardial infarction as the presenting manifestation of systemic lupus erythematosus with antiphosphatidylserine antibodies. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* 1996; 76:266-268.
18. Blank M, Tincani A, Shoenfeld Y. Induction of experimental antiphospholipid syndrome in naive mice with purified IgG anti-phosphatidylserine antibodies. *J Rheumatol* 1994; 21:100-104.
19. McNiel H, Simpson R, Chesterman C, Krilis S. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120.
20. Kandiah D, Krilis S. Beta₂-glycoprotein I. *Lupus* 1994; 3:207-212.
21. Keedy K, Santos M, Lopez L. Anti-phosphatidylserine antibodies require β_2 -glycoprotein I as cofactor in ELISA. *Lupus* 1994; 3:327.
22. Vaarala O, Palosuo T, Kleemola M, Aho K. Anticardiolipin response in acute infections. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1986; 41: 8-15.
23. Maclean C, Flegg PJ, Kilpatrick DC. Anti-cardiolipin antibodies and HIV infection. *Clinical Experimental Immunology*. 1990; 81: 263-266.

SYMBOL LEGEND

											
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Warning	Caution	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtiger	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperaturbeschränkungen	Waarschuwing	Voorzichtigheid	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitätskennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Avertissement	Prudence	Risque biologique	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Advertencia	Precaución	Riesgo biológico	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Avvertimento	Cautela	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



EC REP

MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstraße 80
 D-66386 St. Ingbert/Germany



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020, USA

READS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.

© 2015, Corgenix, Inc.

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK