

ENGLISH

REAADS® IgA Anti-Cardiolipin Semi-Quantitative Test Kit

For In Vitro Diagnostic Use

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of IgA 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 IGA ANTI-CARDIOLIPIN 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}

High serum levels of IgG aCL antibodies are more prevalent and more clinically relevant than IgM aCL antibodies when correlated with clinical manifestations of the APS.^{11,12,13,14} Studies indicate that elevated serum levels of IgA aCL antibodies are also frequently found in patients with SLE and related disorders.^{2,15,16,17} IgA aCL serum levels were significantly higher in SLE patients with vascular complications than those without,¹⁵ and correlated with a predisposition to thrombosis, thrombocytopenia, and fetal loss.^{16,18}

The REAADS IgA Anti-Cardiolipin Test Kit uses a well known ELISA format capable of detecting a specific isotype of aCL antibodies in human serum or plasma. Solid-phase immunoassays are generally considered more sensitive¹⁰ and more specific¹⁹ for detecting aCL antibodies than coagulation assays. The REAADS IgA Anti-Cardiolipin Test Kit provides rapid, highly reproducible, accurate, and objective results in units that have been standardized against a reference preparation. The values for IgA aCL antibodies are reported in APL (IgA antiphospholipid) units.

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 IgA labeled with horseradish peroxidase (HRP) are added forming complexes with the cardiolipin bound antibodies. 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 IgA 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 IgA aCL concentration expressed in APL units. 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 by the O.D. value of the calibrator provides a conversion factor. The O.D. values of the controls and patient samples are multiplied by the conversion factor to obtain IgA aCL values, expressed in APL units. 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 IgA 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 IgA Calibrator Serum* (1-high, 2-moderate, 3-low) (human); see vial label for antibody concentration in APL units. Calibrator 2 should be used when performing single point calibration.
- 1 vial (0.250 mL) aCL IgA Positive Control Serum* (human); see vial label for expected APL range.
- 1 vial (0.250 mL) aCL Normal Control Sera* (human); see vial label for expected APL range.
- 1 bottle (15 mL) anti-human IgA (goat) HRP-conjugated antibody solution (orange 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 sera used to prepare the calibrators and controls included in this kit have been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV, and HIV 1 & 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, the 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 IgA 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 µl and 1000 µl, 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 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, control, and test sera must be made just prior to use in the assay.
3. A 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 µl 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 air or this 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. No interference is caused if the water blank well receives PBS. 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. Carefully 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 (Calibrator 1, 2, and 3 plus sample diluent/reagent blank as Calibrator 4 equal to 0 APL units). One well should also be run as a reagent blank control 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 calibrator, controls, and patient samples in Sample Diluent (green solution); e.g., 10 µl sample added to 490 µl Sample Diluent equals a 1:50 sample dilution.
4. Add 100 µl 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 5 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 IgA HRP-Conjugated Antibody Solution (orange) to the wells corresponding to the IgA 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 solution.
9. Wash 5 times with PBS as in step 7. 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 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 Substrate was added. Blue Substrate Solution will turn yellow and colorless solution 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 of the addition of Stopping Solution.

Results

Single Point Calibration

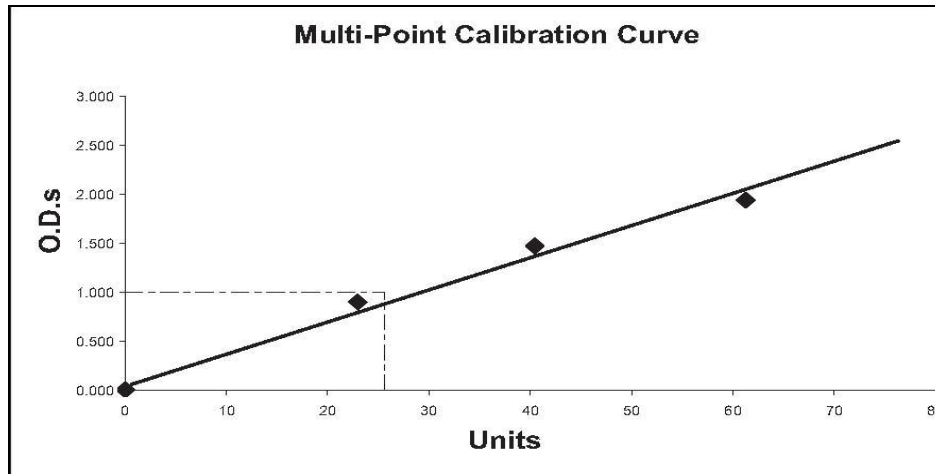
1. Calculate the mean O.D. values if duplicates of Calibrator 2, controls, and patient samples were performed.
2. Divide the concentration value of Calibrator 2 (printed on the vial label) by the O.D. or mean O.D. value of the calibrator serum to obtain the conversion factor.
3. Multiply the O.D. or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

$$\text{Conversion Factor} = \frac{\text{IgA anti-cardiolipin concentration of Calibrator 2 (APL)}}{\text{Absorbance value of the Calibrator 2 (O.D.)}}$$
$$\text{IgA anti-cardiolipin concentration of sample} = \text{Conversion Factor} \times \text{Absorbance of the sample (O.D.)}$$

4. The conversion factor must be calculated for each assay run. Using a conversion factor from another assay 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 APL units. Calibrator 4 [sample diluent] is equal to 0 APL 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. reading 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 0.100 when the spectrophotometer has been blanked against air or a water well. Readings greater than 0.100 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 80 APL may be reported as "greater than 80 APL."
7. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

EXPECTED VALUES

Serum samples from 121 healthy blood donors were tested and the following normal range established (mean + 3 SD):

- Less than 22 APL

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical Specificity

Normal Samples: Serum samples from 121 healthy blood donors were assayed for the presence of IgA aCL antibodies on three separate occasions. The normal cut-off was calculated as the mean APL antibody level plus three standard deviations. The value calculated for the cut-off is 22 APL. Using this cut-off value, the assay is 95% specific for IgA antibodies.

Clinical Sensitivity

SLE:

Serum samples from 144 individuals with SLE were tested in the kit. Thirty-seven of the samples (26%) were positive for IgA 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 non-reactive with the cardiolipin coated microwells.

Other Disease States:

Eighteen serum samples from patients with osteoarthritis (OA) were tested in the assay. None were positive for IgA aCL antibodies.

Ninety-two serum samples from patients with progressive systemic sclerosis (PSS) were tested in the assay. Twenty-seven of the samples (29%) were positive for IgA aCL.

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

SLE and Thrombosis:

Serum samples from 19 patients with SLE or lupus-like disorder, known to have had at least one thrombotic event/thrombocytopenia, were tested in the assay. Fifteen samples were positive for a sensitivity of 79% in this sample population.

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. One of the samples was positive for IgA aCL antibodies. The overall specificity of the assay for this sample population was 93%.

Precision

Two samples with known APL values (one low and one high) were assayed in 26 replicates on three different occasions. The intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) are presented in the table below. The reported intraassay coefficient of variation is the mean of the three separate intraassay CVs.

Sample Mean (aCL conc.)	Mean Intraassay CV	Mean Interassay CV
Low (16.0 APL units)	4.2%	11.3%
High (33.0 APL units)	8.7%	10.7%

LIMITATIONS OF THE TEST

The clinical significance of elevated anti-cardiolipin antibody levels in diseases other than SLE is still under investigation. In published studies, the reported prevalence of IgA aCL antibodies detected in SLE patients varied up to 44%.^{12,17}

When a normal anti-cardiolipin antibody level is found in the presence of clinical manifestations, the lupus anticoagulation test should be performed.²⁰ Diagnosis cannot be made on the basis of anti-cardiolipin positive results alone. These results must be interpreted in conjunction with patient history, clinical symptoms, physical findings, and other diagnostic procedures. Treatment of patients should not be initiated on the basis of a positive anti-cardiolipin antibody result alone. Supporting clinical indications, other laboratory findings, and physician impression must be considered before any treatment is initiated.

A high percent of confirmed active or seropositive syphilis patients will have elevated anti-cardiolipin antibody levels. Confirmatory procedures should be performed to rule out syphilis in anti-cardiolipin antibody positive individuals. Anti-cardiolipin antibodies could appear transiently during many infections. If a patient tests positive for anti-cardiolipin antibodies while there are clinical signs of infection, the tests should be repeated after an appropriate interval.²¹

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.

DEUTSCH

REAADS®

Testkit zur semiquantitativen Bestimmung von IgA-Anti-Kardiolipin

In-vitro-Diagnostikum

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur semiquantitativen Bestimmung von IgA-Anti-Kardiolipin-Antikörpern in Humanserum 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-IgA spezifische Antikörper zugefügt, die dann mit den Kardiolipin-gebundenen Antikörpern komplexieren. Nach einem weiteren Waschschriff 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 IgA-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 IgA-aCL-Konzentrationen in APL-Einheiten ausgedrückt zur Verfügung gestellt. Der Benutzer kann einen Einpunktkalibrator oder eine Vierpunkt-Kalibrationskurve verwenden. Bei der Einpunktkalibration wird zur Berechnung des Umrechnungsfaktors die Konzentration des Kalibrators durch den OD-Wert des Kalibrators dividiert. Die OD-Werte der Kontrollen und Patientenproben werden mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert, um die in APL-Einheiten ausgedrückten Werte für IgA-aCL zu erhalten. 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 IgA-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.
- 1 Fläschchen (60 ml) Probenverdünner* (grüne Lösung); enthält Kälberserum.
- 3 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgA-Kalibratorseren* (1-hoch, 2-mittel, 3-niedrig); die Antikörperkonzentration in APL-Einheiten ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Kalibrator 2 sollte bei Durchführung einer Einpunktkalibration verwendet werden.
- 1 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-IgA-Positivkontrollserum*; der erwartete APL-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben.
- 1 Fläschchen (0,250 ml) Human-aCL-Normalkontrollserum*; der erwartete APL-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben.
- 1 Fläschchen (15 ml) Antihuman-IgA-Antikörperlösung, HRP-konjugiert (Ziege) (orange Lösung).
- 1 Fläschchen (15 ml) Einkomponentensubstrat (TMB und H₂O₂), gebrauchsfertig.
- 1 Fläschchen (15 ml) Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure).
- 2 Fläschchen (30 ml) Waschkonzentrat (33X PBS).

*** ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Humanseren, die zur Herstellung der Kalibratoren und Kontrollen in diesem Kit verwendet wurden, zeigten in den von der FDA geforderten Tests negative Reaktion auf Antikörper zu HbsAg, HCV und HIV 1 und 2. 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).

Warnschwingung . 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. Vollblut sollte durch Venenpunktion gewonnen und das Plasma durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt 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 IgA-Anti-Kardiopilin-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 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 Luft oder diese mit Wasser 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 Plastikspritze mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Wenn PBS in die für die Wasser-Blindprobe vorgesehene Zelle pipettiert wird, kommt es zu keiner Interferenz. 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 APL-Einheiten) durchgeführt werden. Eine Vertiefung sollte auch als Blindversuch unter Verwendung der Einpunkt- und Mehrpunktkalibration dienen. In diese Zelle wird Probenverdünner ohne Serum pipettiert. 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 Kalibrator, 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 verdünnten Kalibrator (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. Fünfmal 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-IgA-Antikörperlösung (orange) in die Zellen, die für IgA-Kalibrator, Kontrollen, Blindprobe und Patientenproben vorgesehen sind, pipettieren.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrozellen entleert.
9. Fünfmal 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. Die blaue Substratlösung schlägt nach gelb um, während bisher farblos gebliebene Lösungen weiterhin farblos bleiben. Der Nullpunkt des Platten-Lesegeräts wird anhand der Wasser-Blindprobe eingestellt. 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 Umrechnungsfaktor multiplizieren, um den Konzentrationswert in APL-Einheiten zu erhalten.

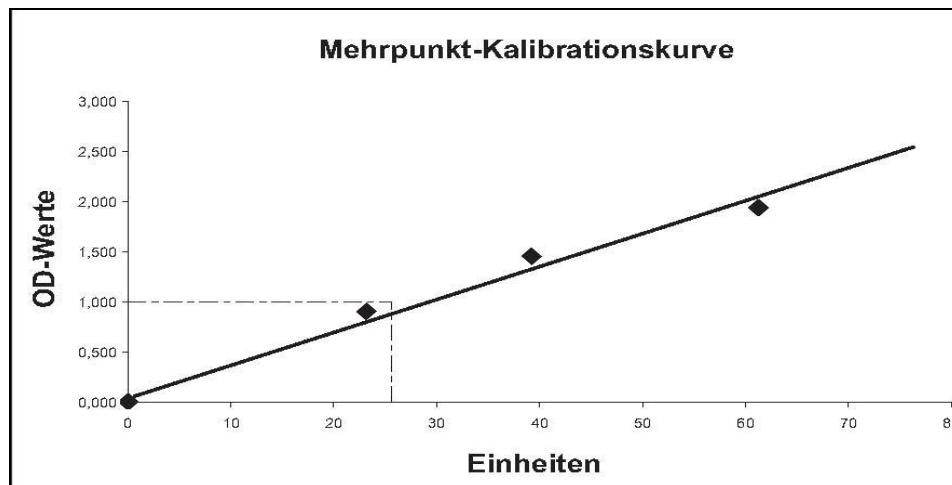
$$\text{Umrechnungsfaktor} = \frac{\text{IgA-Anti-Kardioliplinkonzentration von Kalibrator 2 (APL)}}{\text{Extinktion von Kalibrator 2 (OD)}}$$

$$\text{IgA-Anti-Kardioliplingehalt der Probe} = \text{Umrechnungsfaktor} \times \text{Extinktion der Probe (OD)}$$

4. Der Umrechnungsfaktor muss für jeden Testlauf berechnet werden. Verwendung eines Umrechnungsfaktors aus einem anderen Test 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 APL-Einheiten sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Kalibrator 4 Probenverdünner entspricht 0 APL-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 0,100 liegen, wenn das Spektrophotometer gegen Luft oder eine mit Wasser gefüllte Vertiefung auf Null gestellt wurde. Werte über 0,100 können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Platte bedingt sein.
3. Die für die Kontrollseren erhaltenen Anti-Kardiolipinwerte 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-Kardiolipinwerten von über 80 APL können als „über 80 APL“ angegeben werden.
7. Bevor die Analysenergebnisse angegeben werden, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

NORMALWERTE

Serumproben von 121 gesunden Probanden wurden getestet und der folgende Normalbereich wurde festgesetzt (Mittelwert +3 SD):

- Weniger als 22 APL

GRENZEN DES TESTS

Die klinische Signifikanz erhöhter Anti-Kardiolipin-Antikörperspiegel bei Erkrankungen (außer SLE) wird derzeit noch untersucht. In veröffentlichten Studien schwankte die Prävalenz der bei SLE-Patienten festgestellten IgA-aCL-Antikörper um bis zu 44%.^{12,17}

Wenn bei klinischen Manifestationen normale Anti-Kardiolipin-Antikörperspiegel festzustellen sind, sollte der Lupus-Antikoagulationstest durchgeführt werden.²⁰ Auf Grundlage positiver Anti-Kardiolipin-Ergebnisse allein kann keine Diagnose gestellt werden. Diese Ergebnisse dürfen nur zusammen mit anderen Informationen wie Anamnese, klinische Symptome, körperliche Befunde und Resultate anderer diagnostischer Tests interpretiert werden. Auf Grundlage positiver Anti-Kardiolipin-Antikörperergebnisse allein sollte keine Patientenbehandlung eingeleitet werden. Vor Aufnahme einer Therapie müssen die Diagnose unterstützende klinische Befunde, andere Laborwerte und der ärztliche Eindruck in Betracht gezogen werden.

Erhöhte Anti-Kardiolipin-Antikörperspiegel finden sich bei einem hohen Anteil Patienten mit sicher diagnostizierter aktiver oder seropositiver Syphilis. Bei Anti-Kardiolipin-Antikörper-positiven Patienten muss durch entsprechende Verfahren eine Syphilis ausgeschlossen werden. Anti-Kardiolipin-Antikörper können bei vielen Infektionen vorübergehend vorliegen. Wenn der Test auf Anti-Kardiolipin-Antikörper positiv ist und klinische Symptome einer Infektion vorliegen, muss der Test nach einem angemessenen Zeitraum wiederholt werden.²¹

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.

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

FRANÇAIS

REAADS® Kit de test semi-quantitatif de IgA anticardiolipine

Pour utilisation diagnostique in vitro

Dosage immunoenzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgA 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 IgA humaines couplés à une peroxydase du raifort (PR) sont alors ajoutés formant ainsi des complexes avec les anticorps anticardiolipine déjà fixés. Après un deuxième lavage, le conjugué est révélé par addition du tétraméthylbenzène (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à titre de substrat chromogène. L'intensité de la couleur développée dans les puits est proportionnelle à la concentration des anticorps aCL IgA.

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 IgA sont respectivement exprimées en unités APL. 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, le facteur de conversion s'obtient en divisant la valeur de la concentration de l'étalon par sa D.O. La concentration en unités APL des aCL IgA des contrôles et des échantillons s'obtient en multipliant les D.O. par le facteur de conversion. 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'IgA anticardiolipine REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants
(les volumes varient selon l'ataille et la configuration du kit) :

- 96 micropuits (12 barrettes de 8 puits sécables) enduits de cardiolipine de cœur bovin stabilisée (diphosphatidylglycérol), avec cadre.
- 1 bouteille (60 ml) de tampon d'échantillon* (solution verte) ; contient du sérum de veau.
- 3 flacons (0,250 ml) de sérum aCL IgA (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 APL. Utiliser le flacon 2 pour un étalonnage à point unique.
- 1 flacon (0,250 ml) de sérum aCL IgA (humain) positif de contrôle* ; se reporter aux indications fournies sur l'étiquette du flacon pour les valeurs attendues.
- 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 APL.
- 1 bouteille (15 ml) de conjugué anticorps de chèvre anti-IgA humaine/PR (solution orange).
- 1 bouteille (15 ml) de substrat à un composant (TMB et H_2O_2) prêt à l'emploi.
- 1 bouteille (15 ml) de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N).
- 2 bouteilles (30 ml) de concentré de lavage (33X SPTP).

*** 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  . Biologiques 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 1 500 g 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 IgA 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 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 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 l'air ou sur ce puits 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. Aucune interférence n'est causée s'il arrive que le puits d'eau à blanc reçoive du SPTP. 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. Respecter impérativement la durée des étapes. Il est impératif d'ajouter en moins de 5 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 APL). Un puits doit aussi être analysé en tant que réactif à blanc de contrôle aussi bien avec la méthode d'étalonnage à point unique que multipoint. Du tampon pour échantillon sans sérum est ajouté au 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 5 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 IgA/PR (solution orange) aux puits correspondant aux étalons IgA, 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 la solution conjuguée.

9. Laver 5 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 incubé 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 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 pour obtenir les concentrations en unités APL.

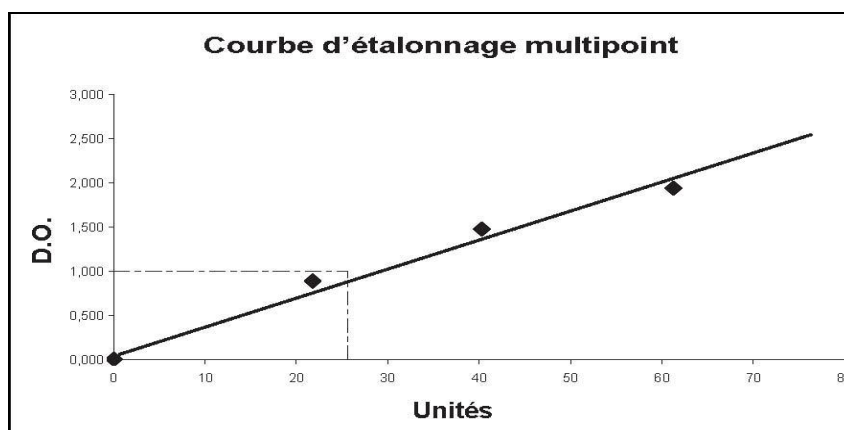
$$\text{Facteur de conversion} = \frac{\text{Concentration en IgA anticardiolipine de l'étalon 2 (APL)}}{\text{Densité optique de l'étalon 2 (D.O.)}}$$

$$\text{Concentration en IgA anticardiolipine de l'échantillon} = \text{Facteur de conversion} \times \text{Densité optique (D.O.) de l'échantillon}$$

4. Le facteur de conversion doit être calculé à chaque dosage. Utiliser un facteur de conversion d'un autre dosage 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 APL des étiquettes des flacons. L'étalon 4, tampon pour échantillon, est égal à 0 unité APL)
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 de l'échantillon 2 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 0,100 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur un puits d'air ou d'eau. Une valeur supérieure à 0,100 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.)
6. Les échantillons dont les valeurs d'anticardiolipine sont supérieures à 80 unités APL peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 80 unités APL ».
7. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

VALEURS NORMALES

121 échantillons de sérum de donneurs sains ont donné les résultats suivants (moyenne + 3 écarts-type) :

- Inférieur à 22 APL

LIMITES DU TEST

La signification clinique des taux d'anticorps anticardiolipine élevés en présence de maladies autres que LES est toujours en cours d'investigation. Dans les travaux publiés, la prévalence d'anticorps anticardiolipine IgA détectés chez les patients LES varie jusqu'à 44 %.^{12,17}

Si un taux d'anticorps anticardiolipine normal est trouvé en présence de manifestations cliniques, il faut pratiquer un test d'anticoagulation lupique.²⁰ Le diagnostic ne peut pas être établi uniquement sur la base de résultats anticardiolipine positifs. Ces résultats doivent être interprétés conjointement avec les antécédents du patient, les symptômes cliniques, l'examen médical et les autres procédures diagnostiques. Le traitement des patients ne doit pas être initié uniquement sur la base d'un résultat d'anticorps anticardiolipine positif. On doit aussi considérer les indications cliniques, les autres résultats de laboratoire et le jugement du médecin avant de commencer un traitement.

Un pourcentage élevé de patients avec syphilis active confirmée ou séropositifs présente des taux d'anticorps anticardiolipine élevés. Il est nécessaire de pratiquer des procédures de confirmation afin d'éliminer la syphilis en cas de sujet positif aux anticorps anticardiolipine. Les anticorps anticardiolipine apparaissent de manière transitoire dans beaucoup d'infections. Si le test d'un patient est positif aux anticorps anticardiolipine en présence de signes cliniques d'infection, il faut répéter le test après un délai approprié.²¹

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 (303) 457-4345 ; télécopie (303) 457-4519 ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

ESPAÑOL

REAADS® Equipo de determinación semicuantitativa de anticardiolipina IgA

Para uso diagnóstico in vitro

Un inmunoensayo enzimático (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos de anticardiolipina IgA en suero o plasma humanos.

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 IgA humana marcados con peroxidasa (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos a la cardiolipina. Tras un segundo paso de lavado, el conjugado de enzima unida al anticuerpo se analiza añadiendo tetrametilbencidina y agua oxigenada (H_2O_2) como sustrato cromógeno. La intensidad con la que se desarrolla el color en los pocillos es proporcional a la concentración sérica de anticuerpos aCL IgA.

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 aCL IgA expresadas en unidades APL. 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 el factor de conversión, divida el valor de la concentración del suero calibrador por el valor medio de la D.O. del suero calibrador. Los valores de la D.O. de las muestras de pacientes y controles se multiplican por el factor de conversión para obtener valores aCL IgA, expresados en unidades APL. Para la calibración multipuntual, realice un análisis de regresión lineal con los valores de los calibradores respecto a las D.O. de los calibradores. Los resultados de pacientes y controles se determinan a partir de la curva de calibración.

REACTIVOS

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

Cada equipo de determinación de anticardiolipina IgA 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.
- 1 botella (60 ml) de diluyente de muestras* (solución verde); contiene suero bovino de ternero.
- 3 frascos (0,250 ml) de sueros calibradores aCL IgA* (1-alto, 2-moderado, 3-bajo) (humano). Véase en la etiqueta del frasco la concentración de anticuerpo en unidades APL. Debe usarse el calibrador 2 al realizar una calibración de un solo punto.
- 1 frasco (0,250 ml) de suero aCL IgA de control positivo* (humano). Véase el intervalo APL esperado en la etiqueta del frasco.
- 1 frasco (0,250 ml) de suero aCL de control normal* (humano). Véase el intervalo APL esperado en la etiqueta del frasco.
- 1 botella (15 ml) de solución de conjugado de anticuerpos anti-IgA humana (de cabra) y HRP (solución naranja).
- 1 botella (15 ml) de sustrato de un componente (TMB y H_2O_2); listo para su uso.
- 1 botella (15 ml) de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N).
- 2 botellas (30 ml) de concentrado para lavado (solución buffer de fosfato (PBS) 33x).

*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro

1. Los sueros humanos empleados para preparar los calibradores y los controles incluidos con este equipo se han examinado y resultaron negativos 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. La sangre debe extraerse mediante venopunción, y el plasma debe separarse de las células mediante centrifugación. 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 IgA 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 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 de los calibradores, los controles y los sueros de prueba 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 aire o a este pocillo de 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. Si el pocillo testigo con agua recibe PBS, no se causa ninguna interferencia. 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 APL). También debe procesarse un pocillo como control de reactivo testigo con los métodos de calibración de punto simple y 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 del calibrador, los controles y las muestras de los 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 calibrador (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 la solución de conjugado. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
6. Lave 5 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-IgA humana y HRP (naranja) a los pocillos correspondientes al calibrador de IgA, los controles, el reactivo testigo y las muestras de pacientes.
8. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y vacíe la solución de conjugado.
9. Lave 5 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 el 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 la solución incolora 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 medirse en los 5 minutos posteriores al añadido 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 APL, 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.

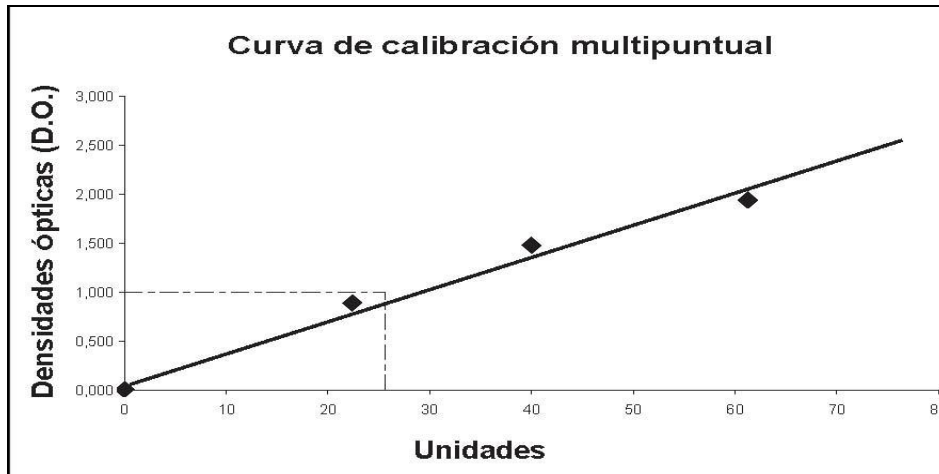
<p>Factor de conversión = <u>Concentración de anticardiolipina IgA de calibrador 2 (APL)</u> Valor de absorbancia del calibrador 2 (D.O.)</p> <p>Concentración de anticardiolipina IgA de la muestra = factor de conversión X absorbancia de la muestra (D.O.)</p>
--

4. El valor de conversión debe calcularse para el calibrador en cada ensayo. Si se utiliza un factor de conversión de otro ensayo, 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 APL. (El calibrador 4 [diluyente de muestras] es igual a 0 unidades APL)
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 de controles y pacientes obtenidos 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 0,100 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto a aire o a un pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,100 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 80 APL pueden especificarse como «más de 80 APL».
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

Se analizaron las muestras de suero de 121 donantes de sangre sanos y se estableció el siguiente rango normal (media +3 desviaciones estándar):

- Menos de 22 APL

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

La importancia clínica de los niveles elevados de anticuerpo anticardiolipina en enfermedades distintas del LED aún está investigándose. En estudios publicados, la prevalencia informada de anticuerpos aCL IgA detectada en pacientes con LED varió hasta el 44 %.^{12,17}

Cuando se encuentra un nivel normal de anticuerpos de anticardiolipina en la presencia de manifestaciones clínicas, debe realizarse la prueba de anticoagulación del lupus.²⁰ No puede darse un diagnóstico solamente sobre la base de resultados de anticardiolipina positivos. Estos resultados deben interpretarse conjuntamente con los antecedentes del paciente, síntomas clínicos, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos de diagnóstico. No debe iniciarse el tratamiento de los pacientes solamente sobre la base de un resultado de anticuerpo de anticardiolipina positivo. Antes de iniciar cualquier tratamiento, deben considerarse las indicaciones clínicas confirmatorias, otros resultados de pruebas de laboratorio y la impresión del médico.

Un alto porcentaje de pacientes con sífilis confirmada activa o seropositivos tendrá niveles elevados de anticuerpos anticardiolipina. Deben realizarse procesos de confirmación para descartar sífilis en individuos positivos para anticuerpos de anticardiolipina. Los anticuerpos anticardiolipina pueden aparecer transitoriamente durante un gran número de infecciones. Si el ensayo de un paciente para anticuerpos de anticardiolipina es positivo cuando existen signos clínicos de infección, el ensayo deberá repetirse después del intervalo adecuado.²¹

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 (303) 457-4345, envíe un fax al (303) 457-4519 o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

ITALIANO

REAADS® Kit per il dosaggio semiquantitativo dell'IgA anti-cardiolipina

Per uso diagnostico in vitro

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgA 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 le IgA umane marcati con perossidasi di rafano (HRP) in modo da formare complessi con gli anticorpi legati alla cardiolipina. 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 IgA 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 IgA aCL espresse in unità APL. L'utente può usare un calibratore a punto singolo o una curva di calibrazione a quattro punti. Per la calibrazione a punto singolo, per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione del siero di calibrazione per il valore di densità ottica del siero di calibrazione. I valori di densità ottica dei controlli e dei campioni dei pazienti vengono moltiplicati per il fattore di conversione per ottenere i valori di IgA aCL espressi in unità APL. 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 delle IgA 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.
- 1 flacone (60 ml) di diluente per campioni* (soluzione verde); contiene siero di vitello.
- 3 fiale (0,250 ml) di sieri di calibrazione* IgA aCL umane (1 alto, 2 medio, 3 basso); vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi in unità APL. Il siero di calibrazione 2 va usato per la calibrazione a punto singolo.
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo positivo* per IgA aCL umane; vedere l'etichetta sulla fiala per l'intervallo APL atteso.
- 1 fiala (0,250 ml) di siero di controllo normale* per aCL umana; vedere l'etichetta sulla fiala per gli intervalli APL attesi.
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di anticorpi ovis anti-IgA umane coniugati con HRP (soluzione arancione).
- 1 flacone (15 ml) di substrato monocomponente (TMB e H₂O₂); pronto per l'uso.
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico).
- 2 flaconi (30 ml) di concentrato di lavaggio (33X PBS).

*** ATTENZIONE - Contiene sodio azide**

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. Il siero umano usato per preparare i calibratori e i controlli inclusi in questo kit è stato analizzato in osservanza ai requisiti della FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi contro l'HBsAg, l'HCV e l'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 . Riesgo 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 devono essere 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 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 delle IgA 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 reagenti a temperatura ambiente a 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 sierici di analisi vanno eseguite immediatamente prima dell'esecuzione del dosaggio.
3. In ciascuna sessione di analisi, su ogni piastra, è possibile analizzare un 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 questo 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. Non si verifica alcuna interferenza se il bianco viene a contatto con il tampone PBS. È anche possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatico per piastre per microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - I 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 del test e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. Tutti i calibratori, i controlli e i campioni vanno aggiunti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve essere maggiore della quantità che può essere aggiunta entro questi 5 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 la calibrazione a punto singolo (Siero di calibrazione 2) o con una curva di calibrazione a quattro punti (Siero di calibrazione 1, 2 e 3 più diluente per campione/bianco reagente come Siero di calibrazione 4 equivalente a 0 unità APL). Un pozzetto va inoltre analizzato come bianco reagente di controllo con i metodi di calibrazione a punto singolo e a più punti. Dispensare nel pozzetto il diluente per campione senza siero. Nelle successive fasi di analisi, questo pozzetto verrà trattato allo stesso modo dei pozzetti dei campioni.
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 del siero di calibrazione, dei controlli e dei campioni prelevati dai pazienti, con l'apposito diluente per campione (soluzione verde); ad esempio: 10 µl di campione aggiunto a 490 µl di diluente per campione equivale ad una diluizione del campione pari a 1:50.
4. Aggiungere 100 µl di siero di calibrazione diluito (incluso il bianco reagente/Siero di calibrazione 4), controlli e campioni da pazienti ai pozzetti appropriati.
5. Far incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato. Evitare la contaminazione degli altri pozzetti con i campioni.
6. Lavare 5 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-IgA umana coniugati con HRP (soluzione arancione) ai pozzetti corrispondenti al calibratore IgA, 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 pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato.
9. Lavare 5 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 di substrato blu diventerà gialla e la soluzione incolore rimarrà invariata. 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

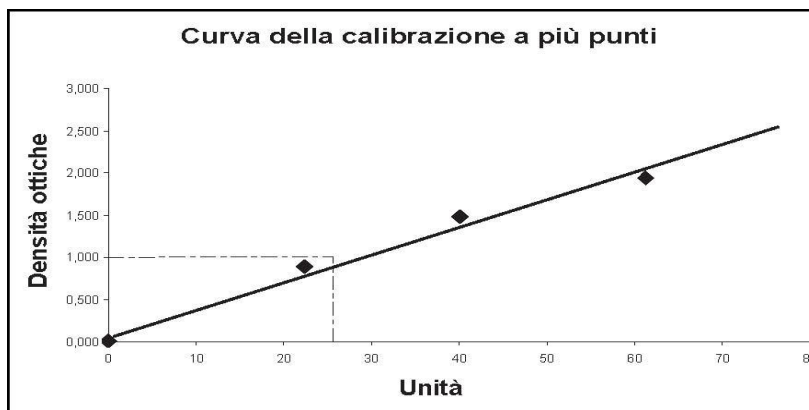
1. Se si sono analizzati il calibratore 2, i controlli e i campioni in duplicato, calcolare i valori medi di densità ottica.
2. Per ottenere il fattore di conversione, dividere il valore della concentrazione calibratore 2 (stampato sull'etichetta della fiala) per il valore di densità ottica o per il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

$$\text{Fatt. convers.} = \frac{\text{Conc. di IgA anti-cardiolipina (APL) nel Calibratore 2}}{\text{Valore di assorbanza del Calibratore 2 (densità ottica)}}$$
$$\text{Conc. di IgA anti-cardiolipina nel campione} = \text{Fatt. convers.} \times \text{Assorbanza del campione (densità ottica)}$$

4. Il fattore di conversione va calcolato per ciascuna analisi. Se si usa un fattore di conversione da un altro dosaggio, i risultati non saranno 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 dei calibratori rispetto alle O.D. medie per ciascun calibratore. (Per le unità APL, vedere le etichette delle fiale; il calibratore 4, diluente per campione, equivale a 0 unità APL)
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. Un risultato di densità ottica del calibratore 2 minore di 0,600 indica che il kit non è 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 0,100. Valori più alti di 0,100 potrebbero 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 80 APL possono essere riportati come “superiori a 80 APL”.
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

Sono stati analizzati campioni di siero da 121 donatori di sangue sani ottenendo il seguente range di normalità (media + 3 DS):

- Meno di 22 APL

LIMITI DEL TEST

L'importanza clinica di elevati livelli di anticorpi anti-cardiolipina in patologie diverse dal LES è ancora in fase di indagine. Studi pubblicati hanno indicato che la prevalenza degli anticorpi IgA aCL rilevata nei pazienti affetti da LES è variata fino al 44%.^{12,17}

Quando si riscontra un livello normale di anticorpi anti-cardiolipina in presenza di sintomi clinici, è necessario eseguire il test del lupus anticoagulante.²⁰ Non è possibile eseguire la diagnosi unicamente in base a un risultato positivo del test dell'anti-cardiolipina. Tali risultati vanno interpretati nel contesto dell'anamnesi del paziente, e nel quadro clinico dei sintomi e dei segni fisici, e di altre procedure diagnostiche. Il trattamento dei pazienti non va iniziato unicamente in base a un risultato positivo relativamente agli anticorpi anti-cardiolipina. Segni clinici, altre prove di laboratorio e l'opinione del medico vanno attentamente considerati prima di iniziare qualsiasi trattamento.

Un'alta percentuale di pazienti affetti da sifilide confermata in atto o sieropositivi per la sifilide presenta elevati livelli di anticorpi anti-cardiolipina. Procedure di conferma vanno quindi eseguite per escludere la sifilide negli individui che presentano risultati positivi per gli anticorpi anti-cardiolipina. Gli anticorpi anti-cardiolipina possono presentarsi in maniera transitoria nel contesto di molte infezioni. Se un paziente risulta positivo ad un test per gli anticorpi anti-cardiolipina mentre esistono segni clinici di infezione, il test va ripetuto dopo un opportuno intervallo.²¹

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 (303) 457-4345, inviare un fax al numero (303) 457-4519, o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 11(3): 591, 1985.
2. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anti-cardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 46:1, 1987.
3. Espinoza LR, Hartman RC. Significance of the lupus anticoagulant. *Am J Hematol* 22:331, 1986.
4. Elias M, Eldor A. Thromboembolism in patients with the "lupus"-type circulating anticoagulant. *Arch Intern Med* 144:510, 1984.
5. Fields RA, Toubbeh H, Searles RP, Bankhurst AD. The prevalence of anti-cardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 16:623, 1989.
6. Buchanan RRC, Wardlaw JR, Riglar AG, Littlejohn GO, Miller MH. Anti-phospholipid antibodies in connective tissue diseases: their relation to the anti-phospholipid syndrome and forme fruste disease. *J Rheumatol* 16:757, 1989.
7. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 13(3):486, 1986.
8. Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies-clinical associations. *Postgraduate Med J* 62:1081, 1986.
9. Asherson RA. Antibodies to phospholipid and the "anti-phospholipid syndrome." *Immunology Updates* 1(2):1, 1989.
10. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* ii 1211, 1983.
11. Harris EN. A Reassessment of the Antiphospholipid Syndrome. *J. Rheumatol.* 17:733, 1990.
12. McNeil HP, Chesterman CN, and Krilis SA. Immunology and Clinical Importance of Antiphospholipid Antibodies. *Advances in Immunology* 49:193, 1991.
13. Lopez LR, Peterson TR, Sauer NK, Hites MJ, Collier DH, and Ensenhauer RJ. Prevalence of Antibodies to Cardiolipin in Rheumatic Diseases Detected by a Standard Enzyme Immunoassay. *Clin. Experimental Rheumatology* 8:215, 1990.
14. Lopez LR, Hites MJ, and Loker J. Association of Anti-Cardiolipin Antibodies with Thrombosis, Thrombocytopenia and Recurrent Abortion in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Thrombosis and Haemostasis* 65:1004, 1991.
15. Mahmood T, Racis SP, Krey PR. IgA Anti-Cardiolipin Antibody (aCLA) in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Arthritis and Rheumatism* 33:R45, 1990.
16. Kalunian KC, Peter JB, Middlekauff HR, Sayre J, Ando DG, Mangotich M, Hahn BH. Clinical Significance of a Single Test for Anti-Cardiolipin Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The American Journal of Medicine* Vol. 85, 602-608, 1988.
17. Weidmann CE, Wallace DJ, Peter JB, Knight PJ, Bear MB, Klinenberg JR. Studies of IgG, IgM and IgA Antiphospholipid Antibody Isotypes in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 15:74-79, 1988.
18. Santos ME, Adams JL, LaRosa FG, and Lopez LR. IgA Anti-Cardiolipin Antibodies in SLE Patients: Clinical Correlation with Thrombosis, Thrombocytopenia and Recurrent Abortion. *Arthritis Rheumatism* 34:S129, 1991.
19. Triplett DA, Brandt JT, Kaczor D, Schaeffer J. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am J Clin Pathol* 79:678, 1983.
20. Harris EN. Solid phase anti-cardiolipin test revisited. *Am J Med* 85:599, 1988.
21. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis: type, incidence and cause. *JAMA* 150(5):467, 1952.

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	Temperatur-beschränkungen	Warnschwing	Voorzichtigheid	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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



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.
 © 2015, Corgenix, Inc.