

TESTE DE TRIAGEM RELISA® PARA ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Números de Catálogo: 7096-01 (96 poços) e 7696-01 (576 poços)

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de imunoenensaio enzimático (EIA) para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgA e IgM anticardiolipina em soro humano. Este sistema de teste destina-se ao uso como auxiliar na avaliação de risco de transtornos trombóticos em indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico ou síndromes do tipo lúpus.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os anticorpos antifosfolípeos, inclusive os anticorpos anticardiolipina, são detectados com frequência em soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (1). Numerosos relatos associaram esses autoanticorpos com vários transtornos trombóticos venosos e arteriais, inclusive infarto cerebral (2), trombose venosa profunda (3), trombocitopenia (1), embolia pulmonar (4) e perda fetal recorrente com infarto de placenta (5). O “anticoagulante do lúpus” (6), substância que prolonga o teste *in vitro* de tromboplastina parcial ativada, também foi associado a essas síndromes clínicas, embora não seja idêntico ao anticorpo anticardiolipina. Os termos “anticoagulante do lúpus” e “anticorpos antifosfolípeos” são, às vezes, incorretamente usados um pelo outro, embora essas imunoglobulinas não sejam iguais (1).

O sistema de teste da Immuno Concepts é um imunoenensaio enzimático em micropoços para detecção de anticorpos anticardiolipina em soro humano. Já se demonstrou que o imunoenensaio de fase sólida é um método extremamente sensível e específico para detecção de anticorpos anticardiolipina (7-10). O sistema de teste da Immuno Concepts foi padronizado usando uma preparação de referência reconhecida internacionalmente, obtida do Antiphospholipid Standardization Laboratory (Laboratório de padronização de antifosfolípeos), [os “Padrões de Harris” (9)]. Os resultados qualitativos obtidos neste ensaio indicam a presença ou ausência de anticorpos anticardiolipina.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste é um EIA indireto qualitativo. Uma preparação estabilizada de cardiolipina foi usada para revestir a superfície dos micropoços, visando servir como antígeno neste sistema. Soro, controles e amostras diluídas dos pacientes calibrados são colocados nos micropoços e incubados, permitindo que os anticorpos anticardiolipina da amostra reajam com o antígeno na fase sólida. Depois de lavagem para remover os anticorpos não-ligados e outras proteínas do soro, os poços são incubados com anticorpos anti-humanos de cabra marcados com *horseradish* peroxidase. A preparação de anticorpo conjugado a *horseradish* peroxidase que é incluída no sistema de teste detectará IgG, IgA e/ou IgM humanas, mas não fará a diferenciação entre elas. Para a detecção e semiquantificação de anticorpos IgG e IgM anticardiolipina específicos, deve-se usar o Sistema de teste RELISA® para anticorpos IgG e IgM anticardiolipina da Immuno Concepts, número de catálogo 7096-02.

Depois da incubação com o conjugado HRP, se os resultados forem positivos, forma-se um complexo estável de três partes. Este complexo consiste no anticorpo anti-humano conjugado com HRP ligado ao anticorpo anticardiolipina humano, que é ligado à cardiolipina estabilizada na superfície de plástico. Após outra etapa de lavagem, esse complexo é detectado adicionando-se uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ como substrato cromogênico. O grau de desenvolvimento de cor em cada poço é proporcional à concentração de anticorpos anticardiolipina em cada amostra de soro. Cada micropoço é lido em um espectrofotômetro e os resultados são obtidos por comparação das absorvâncias dos poços do calibrador com as absorvâncias dos poços de amostra.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Não congelar.

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Tiras de micropoços revestidos de cardioplipina **PLATE:** Número de Catálogo 7008-01. Um suporte para micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos de solução estabilizada de difosfatidilglicerol (cardiolipina) de coração de boi. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. As tiras não utilizadas podem ser recolocadas na bolsa de papel alumínio com a bolsa de agente dessecante, vedada com o fecho tipo zíper e refrigeradas por até 45 dias.

Diluyente da amostra **SOLN|DIL:** Número do Catálogo 7100 (100 ml). Diluyente tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes. Esse diluyente contém o cofator apolipoproteína H.

Soro de controle positivo para anticorpo anticardioplipina **CONTROL|+:** Número de Catálogo 7021-01. Frasco contendo 2 ml de soro humano positivo de controle para anticardioplipina pronto para usar. Este soro contém anticorpos IgG, IgM ou IgA anticardioplipina. Esse soro mostra desenvolvimento de coloração positiva forte neste ensaio.

Soro de controle negativo para anticorpo anticardioplipina **CONTROL|-:** Número de Catálogo 7031-01. Frasco contendo 2 ml de soro humano negativo de controle para anticardioplipina pronto para usar. Este soro não apresenta desenvolvimento de cor neste ensaio.

Soro calibrador para anticorpo anticardioplipina **CAL:** Número de Catálogo 7026-01. Frasco contendo 2 ml de soro calibrador humano pronto para usar líquido e estável positivo para anticardioplipina humana. Este soro contém anticorpos IgG e IgM anticardioplipina. Este soro calibrador fornece o valor de corte para este ensaio.

Reagente para anticorpo enzimático - Específico para IgG, IgA e IgM humanas **CONJ|HRP:** Número de Catálogo 7009-01 (14 ml). IgG, IgM e IgA anti-humanas polivalentes conjugadas com *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

Solução de substrato **SOLN|SUB**   : Número de Catálogo 7035 (14 ml). Solução de substrato enzimático específico para HRP, contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O reagente vem pronto para usar. **PERIGO:** Inflamável. Este reagente contém menos de 25% de metanol e acetona. Mantenha fora do alcance de crianças. Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico.

Reagente de parada **SOLN|STOP**   : No de Catálogo 7033 (14 ml). Reagente de parada patenteado para sistemas de testes EIA da Immuno Concepts. O reagente vem pronto para usar. **PERIGO:** Corrosivo. Esse reagente contém ácido clorídrico e ácido sulfúrico e devem ser manuseados com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Suporte para os micropoços

Tampão PBS **PWDR|PBS:** Número de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. Para cada placa de 96 micropoços são fornecidas duas bolsas de tampão em pó no kit completo do teste.

Preparação: Dissolver uma bolsa de tampão em pó em um litro de água desionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis. **NÃO ADICIONAR TWEEN 20 OU OUTROS DETERGENTES A ESTE TAMPÃO.**

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetadores de precisão volumétrica para dispensar volumes de 10-1000 µl
Almotolia para dispensar solução tampão de lavagem nos micropoços ou sistema de lavagem automática dos micropoços
Recipiente de um litro para tampão PBS de lavagem
Água desionizada e destilada
Espectrofotômetro de leitura de placa capaz de ler absorbância em 450 nm
Tubos de ensaio para preparar diluições de soro
Papel absorvente ou papel-toalha
Pipetador multicanais capaz de dispensar em 8 poços
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados neste produto foram testados e foram negativos (repetidamente não-reativos) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os materiais devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todos os soros de controle, soros calibradores e as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante nos soros de controle e calibrador. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
4. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
5. Não aquecer as amostras de soro inativado que serão usadas para o teste de anticardiolipina. Aquecer substâncias inativadas pode causar valores elevados.
6. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
7. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida em quantidade abundante de água.
8. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
9. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
10. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
11. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos. As amostras devem ficar confinadas aos micropoços durante o teste.
12. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
13. Deixar todos os reagentes, micropoços e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
14. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
15. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
16. O reagente de parada é corrosivo e pode causar queimaduras. Esse reagente contém ácido clorídrico e ácido sulfúrico e devem ser manuseados com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

A Immuno Concepts não recomenda o uso de plasma neste ensaio, devido à possibilidade de contaminação do plasma com plaquetas. As plaquetas podem afetar os resultados, devido à reação com anticorpos antifosfolípidos.

CUIDADO: Não aquecer as amostras de soro inativado que serão usadas para o teste de anticardiolipina. Aquecer substâncias inativadas pode causar valores elevados.

Substâncias interferentes: O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado porque essas condições podem ocasionar resultados aberrantes. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em freezer com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

NOTAS GERAIS SOBRE O PROCEDIMENTO

1. É extremamente importante deixar todos os componentes do kit e as amostras de soro em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar. Um litro inteiro de tampão de lavagem pode demorar várias horas para se aquecer até 20 °C depois de ser removido do refrigerador. As temperaturas de incubação acima ou abaixo da faixa determinada podem causar resultados imprecisos. Recolocar as amostras e reagentes não usados no armazenamento refrigerado.
2. Misturar bem os reagentes antes de usar, invertendo os frascos suavemente. Não usar vórtex nem agitar os reagentes. Evitar produção de espuma.
3. Ao preparar diluições de amostra, as pontas da pipeta devem ser limpas primeiro, para dispensar o soro no diluente da amostra. O excesso de amostra que adere ao lado externo da ponta da pipeta afeta os resultados.
4. O uso de pipetador multicanais é recomendado porque proporciona dispensação do reagente, tempos de incubação e tempos de reação mais uniformes.
5. **A lavagem apropriada dos poços é de extrema importância.** Os poços inadequadamente lavados apresentam altos valores de fundo e pode mostrar valores falso-positivos. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir essa etapa por um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual. O uso de sistema automático de lavagem de micropoços garante a lavagem uniforme dos poços e é recomendado.
NOTA: Devido aos vários tipos de técnicas de lavagem e de sistemas automáticos, o número de lavagens deve ser ajustado de modo a se obter os resultados ideais. Cada laboratório deve determinar o número mais eficiente de lavagens para seu sistema.
6. A remoção imprópria de tampão de lavagem residual pode causar desenvolvimento irregular das cores. As tiras de micropoços devem ser vigorosamente batidas e secas em papel absorvente ou toalhas para minimizar os resíduos de tampão de lavagem.
7. O tempo de todas as etapas é essencial. Todas as amostras de soro devem ser diluídas antes do início do procedimento, e devem ser dispensadas nos micropoços no menor período de tempo possível (não mais de cinco minutos). O tamanho dos lotes deve ser definido de modo que a manipulação das amostras possa ser realizada confortavelmente dentro desse período.
8. Com exceção da última incubação (solução de substrato), o início de cada período de incubação ocorre no término da dispensação da amostra ou do reagente. A incubação da solução de substrato deve ser exatamente 15 minutos para cada poço. Todas as amostras e reagentes devem ser dispensados na mesma sequência e em velocidade constante.
9. Não usar Tween 20, Triton X-100 ou outros detergentes nos tampões de lavagem nem em outros reagentes usados neste ensaio.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CÁLCULOS

Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco de IgM dos valores de absorbância obtidos nos poços calibradores de IgM, controle e amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média líquida para poços duplicados.

CONTROLE DE QUALIDADE

1. O valor de absorbância média líquida dos poços calibradores deve ser pelo menos 0,150. O valor de absorbância média líquida do calibrador é usado como ponto de corte para o ensaio.

2. O poço de controle de solução de branco deve ter absorvância inferior a 100. Os valores de absorvância da solução de branco superiores a 100 indicam lavagem inadequada ou contaminação dos reagentes.
3. Os poços que contêm controle positivo devem apresentar absorvância líquida maior que o valor de corte. Os poços que contêm controle negativo devem apresentar absorvância líquida menor que o valor de corte. Se os controles não corresponderem aos limites, o teste é inválido e precisa ser repetido.
4. O valor de corte deve ser obtido para cada execução. Usar o valor de corte de outra execução invalidará os resultados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

1. Os poços de amostra do paciente que têm valores de absorvância maiores ou iguais ao valor de corte são considerados positivos para anticorpos anticardiolipina. Os poços de amostra do paciente que têm valores de absorvância líquida inferiores ao valor de corte são considerados negativos para anticorpos anticardiolipina.
2. Os poços de amostras que têm valores de absorvância inferiores, porém dentro de 5% do valor de corte são considerados limítrofes. Os resultados limítrofes devem ser repetidos ou testados para anticorpos IgG e IgM específicos anticardiolipina usando-se o Sistema de teste RELISA[®] para anticorpos IgG e IgM anticardiolipina da Immuno Concepts, número de catálogo 7096-02.

LAUDO DE RESULTADOS

Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos para anticorpos anticardiolipina.

VALORES ESPERADOS

PREVALÊNCIA ESPERADA DE ANTICORPOS

Numerosos estudos demonstraram a associação de anticorpos anticardiolipina e lúpus eritematoso sistêmico (1, 7, 8, 11-16). Nesses estudos, a prevalência de anticorpos IgG anticardiolipina variou de 23% a 54% (média 41,4%), e os níveis de anticorpos IgM anticardiolipina variou de 5% a 41% (média 25,5%). As diferenças na prevalência observada entre esses estudos provavelmente se devem a critérios de seleção de pacientes e às populações de pacientes estudadas. O Sistema de teste RELISA[®] de triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts foi usado para testar amostras de soro de 60 pacientes que foram atendidos em consultório reumatológico. Essa população de pacientes foi selecionada devido às doenças reumáticas clínicas, mas não devido a qualquer estado patológico específico. Nessa população, 23 amostras (38,3%) foram positivas para anticorpos anticardiolipina.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas nos títulos de anticorpo anticardiolipina. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anticardiolipina. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Se o paciente for negativo para anticorpos anticardiolipina, mas os achados clínicos sugerirem a presença de anticorpos antifosfolídeos, alguns pesquisadores recomendam testar o anticoagulante do lúpus para confirmar os resultados negativos de anticardiolipina. Se os resultados para anticorpo anticardiolipina ou para anticoagulante do lúpus forem positivos, o paciente é considerado positivo para anticorpos antifosfolídeos (1).
4. Os pacientes com sorologia positiva para infecções sífilíticas podem apresentar resultado positivo para anticorpos anticardiolipina. Esses pacientes são considerados, em geral, sem maior risco de trombose, como se observa nos pacientes com doenças reumáticas com anticorpos anticardiolipina. Dezesete amostras de pacientes com sífilis confirmada, ativa ou com cicatriz sorológica (positiva para FTA-Abs e/ou MHA-TP) foram testadas no Sistema de teste RELISA[®] para triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts. Treze (76,5%) dessas amostras eram positivas para anticorpos anticardiolipina. O diagnóstico de sífilis deve ser confirmado ou excluído por ensaios para anticorpo antitreponema.
5. Os anticorpos anticardiolipina podem ocorrer transitoriamente durante muitas infecções. Se um paciente tiver teste positivo enquanto existem sinais clínicos de infecção, o teste deve ser repetido depois que a infecção se resolver.
6. Este teste é qualitativo, e determina a presença ou ausência de anticorpos anticardiolipina. O teste não pode ser usado para determinar níveis quantitativos de anticorpos anticardiolipina.
7. Este teste é de triagem e usa um conjugado imunoglobulínico anti-humano polivalente. O teste detecta anticorpos anticardiolipina das classes IgG, IgM ou IgA, mas não faz a diferenciação entre elas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Controles normais: As amostras de soro de 141 doadores de sangue saudáveis foram testadas usando o Sistema de testes RELISA® de triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts. Cinco dessas amostras foram positivas para anticorpos anticardiolipina. Com base nessa população não selecionada, o Sistema de teste RELISA® de triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts tem especificidade de 96,5% para anticorpos anticardiolipina.

Controles de doença reumática: As amostras de soro de 20 pacientes com doenças reumáticas que não o LES, e sem história de episódios trombóticos, foram testadas no Sistema de teste RELISA® para triagem de anticorpos anticardiolipina da Immuno Concepts. Nenhuma dessas amostras foi positiva para anticorpos anticardiolipina. A especificidade do ensaio nesta população foi 100%.

SENSIBILIDADE CLÍNICA

O Sistema de teste RELISA® de triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts foi usado para testar amostras de soro de 60 pacientes que foram atendidos em consultório reumatológico. Essa população de pacientes foi selecionada devido às doenças reumáticas clínicas, mas não devido a qualquer estado patológico específico. Nessa população, 23 amostras (38,3%) foram positivas para anticorpos anticardiolipina.

As amostras de soro de 25 pacientes com LES e história de pelo menos um episódio trombótico foram testadas no Sistema de teste RELISA® de triagem de anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts. Quinze (75%) dessas amostras eram positivas para anticorpos anticardiolipina.

BIBLIOGRAFIA

- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anti-phospholipid Antibodies. Clin. Rheum. Dis. 11:591-609, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Asherson, R.A., et al. Cerebral infarction in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. Clin. Exp. Rheumatol. 2:47-51, 1984.
- Mueh, J.R., Herbst, K.D., Rapaport, S.I. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann. Intern Med. 92:156-159, 1980.
- Anderson, N.E., Ali, M.R. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism and fatal pulmonary hypertension. Ann. Rheum. Dis. 43:760-763, 1984.
- Derue, G.J., Englert, H.J., Harris, E.N., et al. Fetal loss in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. J. Obstet. Gynaecol. 5:207-209, 1985.
- Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., Elkon, K.B., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Brit. Med. J. 287:1021-1023, 1983.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin Antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet ii:1211-1214, 1983.
- Loizou, S., McCreagh, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., and Harris, E.N. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Lancet 62:738-745, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arth. Rheum. 30:835-837, 1987.
- Harris, E.N. Solid-phase anticardiolipin test revisited. Am. J. Med. 85:599-601, 1988.
- Colaco, C.B., Male, D.K. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. Clin. Exp. Immunol. 59:449-456, 1985.
- McHugh, N.J., Maymo, J., Skinner, R.P., James, I., and Maddison, P.J. Anticardiolipin antibodies, livedo reticularis, and major cerebrovascular and renal disease in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 47:110-115, 1988.
- Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H., and Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 56:193-199, 1984.
- Cronin, M.E., Biswas, R.M., Van der Straeten, C., Fleisher, T.A., and Klippel, J.H. IgG and IgM Anticardiolipin Antibodies in Patients with Lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol. 15:795-798, 1988.
- Sturfelt, G., Nived, O., Norberg, R., Thorstensson, R., and Krook, K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 30:382-388, 1987.
- Ishii, Y., Nagasawa, K., Mayumi, T., and Niho, Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 49:387-390, 1990.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

TESTE DE TRIAGEM RELISA® PARA CARDIOLIPINA

Todas as amostras, reagentes (inclusive a solução tampão de lavagem) e os micropoços devem estar em temperatura ambiente antes do uso.

- 1. PREPARAÇÃO DA PLANILHA**

Etiquetar a planilha incluída no kit para indicar a localização das amostras nos micropoços. Testar o soro calibrador e os de controle em duplicata. Um poço é usado como reagente. Recomendamos que cada amostra do paciente, calibrador e controle sejam testados em duplicata até que você estabeleça uma precisão aceitável para o ensaio em seu laboratório.
- 2. RECONSTITUIÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM (PBS)**

Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão em um litro de água desionizada ou destilada. O PBS pode ser tampado e armazenado de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas.
- 3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE**

Diluir as amostras do paciente até 1:100 adicionando 10 µl de soro a 990 µl do diluente da amostra. Misturar bem. Os controles e o calibrador são fornecidos na diluição de trabalho e não exigem mais diluição.
- 4. PREPARAÇÃO DOS MICROPOÇOS**

Remover o número necessário de tiras de micropoços da bolsa e colocá-las no suporte. Os micropoços devem ficar firmemente assentados nesse suporte. Pressionar firmemente os dois lados das tiras, de modo que elas encaixem com segurança no suporte. Ao usar poços individuais ou menos que uma tira completa de poços, certificar-se que cada poço esteja firmemente assentado. Os poços adequadamente assentados não caem quando o suporte é invertido. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. Os poços não usados podem ser recolocados na bolsa de papel alumínio, vedada com o fecho tipo zíper e refrigerados por até 45 dias.
- 5. DISPENSAÇÃO DE DILUIÇÕES DE SORO**

Dispensar 100 µl dos calibradores, controles e amostras do paciente nos poços apropriados como indicado na planilha. Dispensar 100 µl de diluente da amostra no poço de branco do reagente.
- 6. INCUBAR MICROPOÇOS (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. Os poços devem ser protegidos de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, os poços podem ser cobertos com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.
- 7. LAVAGEM DOS MICROPOÇOS (Ver Notas de Procedimentos Gerais 5 e 6)**

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir essa etapa por um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.
- 8. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE ANTICORPO ENZIMÁTICO**

Dispensar 100 µl de reagente de anticorpo enzimático em cada um dos poços.
- 9. INCUBAR MICROPOÇOS (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C).**

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. Os poços devem ser protegidos de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, os poços podem ser cobertos com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.
- 10. LAVAGEM DOS MICROPOÇOS**

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir essa etapa por um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.
- 11. DISPENSAÇÃO DE SOLUÇÃO DE SUBSTRATO**

Usando um temporizador para garantir intervalos iguais, dispensar 100 µl de solução de substrato a cada um dos poços. A solução de substrato deve ser adicionada aos poços em velocidade constante, de modo que cada um deles seja incubado exatamente pela mesma extensão de tempo (15 minutos). A solução de substrato nos poços incubados com amostras positivas fica azul e a solução nos poços incubados com amostras negativas serão incolores a azul muito claro.
- 12. INCUBAR MICROPOÇOS (Exatamente 15 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**

Incubar em temperatura ambiente por exatamente 15 minutos. Os poços devem ser protegidos de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação.
- 13. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE PARADA**

Depois que o primeiro poço for incubado por exatamente 15 minutos, adicionar 100 µl de reagente de parada a cada poço, na mesma ordem e na mesma velocidade que a solução de substrato foi adicionada aos poços. À adição do reagente de parada, a solução de substrato azul fica amarela e a solução incolor permanece incolor.
- 14. LEITURA DA ABSORBÂNCIA DOS POÇOS**

Dentro de 30 minutos depois da adição do reagente de parada, os poços podem ser lidos em um espectrofotômetro de leitura de placa. Os poços são lidos em 450 nm contra o poço de branco de reagente. Ao se usar espectrofotômetro de comprimento de onda duplo, o comprimento de onda para o filtro de referência deve ser 600-650 nm. A leitura dos micropoços em 450 nm sem filtro de referência resultará em valores de absorbância maiores.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 For a dos EUA: 1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

