



## **ANALISI DEGLI ANTICORPI IgG e IgM ANTICARDIOLIPINA RELISA®**

**Per Uso Diagnostico In Vitro**

**Per Uso Professionale**

**Numero di catalogo: 7096-02 (96 pozzetti) e 7696-02 (576 pozzetti)**

*USO PREVISTO: sistema di analisi a dosaggio immunoenzimatico (EIA) per la determinazione e la misurazione di anticorpi IgG e IgM diretti contro la cardiolipina nel siero umano. Questo sistema di analisi deve essere usato come ausilio nella valutazione di disturbi trombotici in soggetti con lupus eritematoso sistemico o sindromi simili al lupus.*

### **RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE**

Anticorpi antifosfolipidi, compresi anticorpi anticardiolipina, si rilevano di frequente in sieri di pazienti con lupus eritematoso sistemico (1). Numerosi studi hanno associato questi autoanticorpi a vari disturbi trombotici arteriosi e venosi compresi infarto cerebrale (2), trombosi venosa profonda (3), trombocitopenia (1), embolia polmonare (4) e aborti ricorrenti con infarto placentare (5). Anche il "lupus anticoagulante" (6), una sostanza che prolunga l'analisi basata sulla tromboplastina parziale attivato in vitro, è stato associato a queste sindromi cliniche anche se non è identico all'anticorpo anticardiolipina. I termini "lupus anticoagulante" e "anticorpi antifosfolipidi" vengono talvolta erroneamente usati come intercambiabili sebbene queste immunoglobuline non siano le stesse (1).

Il sistema di analisi della Immuno Concepts è un dosaggio immunoenzimatico in micropozzetti per la determinazione di anticorpi anticardiolipina nel siero umano. È stato precedentemente dimostrato che l'immunodosaggio a fase solida è un metodo estremamente sensibile e specifico per la determinazione di anticorpi anticardiolipina (7-10). Il sistema di analisi della Immuno Concepts è stato standardizzato usando un preparato di riferimento riconosciuto in tutto il mondo ottenuta dall'Antiphospholipid Standardization Laboratory (Laboratorio di standardizzazione antifosfolipidi), gli "Standard Harris" (9). I risultati oggettivi ottenuti in questa analisi sono riportati come unità GPL per gli anticorpi IgG anticardiolipina e come unità MPL per gli anticorpi IgM anticardiolipina.

### **PRINCIPIO DEL TEST**

Questa analisi è un EIA (Enzyme Immunoassay, dosaggio immunoenzimatico) indiretto. In questo sistema, la superficie dei micropozzetti è stata rivestita con un preparato stabilizzato di cardiolipina che funge da antigene. Il siero di calibrazione, i controlli e i campioni diluiti del paziente sono messi nei micropozzetti ed incubati lasciando reagire gli anticorpi anticardiolipina nel campione con l'antigene in fase solida. Dopo il lavaggio per rimuovere l'anticorpo non legato e le altre proteine del siero, i pozzetti sono incubati con anticorpi anti-IgG o IgM umane etichettati con perossidasi di rafano. Nel sistema di analisi sono inclusi due preparati di anticorpi coniugati con perossidasi di rafano. Uno di questi è specifico per le IgG umane e l'altro per le IgM umane. Le concentrazioni di anticorpi IgG e IgM anticardiolipina devono essere stabilite separatamente usando questi due coniugati.

Se i risultati sono positivi, dopo l'incubazione col coniugato di perossidasi di rafano si forma un complesso stabile in tre parti. Questo complesso consiste di anticorpo anti-umano coniugato con perossidasi di rafano legante l'anticorpo anticardiolipina umano che è legato alla cardiolipina stabilizzata sulla superficie di plastica.

Dopo un'altra fase di lavaggio, questo complesso viene rilevato aggiungendo una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come substrato cromogenico. Il grado di viraggio del colore in ciascun pozzetto è proporzionale alla concentrazione di anticorpi anticardiolipina in ciascun campione di siero. Ciascun micropozzetto è letto in uno spettrofotometro e i risultati sono ottenuti attraverso il confronto tra le assorbanze dei pozzetti di calibrazione e le assorbanze dei pozzetti del campione.

# COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

**Conservazione:** tutti i componenti vanno conservati alla temperatura di 2-10°C. Non congelare.

**Stabilità:** tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

## REAGENTI REATTIVI

**Strisce di micropozzetti rivestiti con cardioplipina **PLATE**:** numero di catalogo 7008-01. Piastra con dodici strisce da otto pozzetti ciascuna rivestiti con una soluzione stabilizzata di difosfatidilglicerolo (cardiolipina) da cuore di bovino. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essicante provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.

**Diluente del campione **SOLN|DIL**:** numero di catalogo 7100 (100 ml). Esclusivo diluente tamponato per campioni utilizzato per la diluizione dei campioni dei pazienti. Questo diluente contiene cofattore H apolipoproteina.

**Controllo positivo dell'anticorpo IgG anticardiolipina **CONTROL|+**:** numero di catalogo 7021-02G. Fiala contenente 1,5 ml di siero di controllo umano positivo anticardiolipina pronto all'uso. Questo siero contiene anticorpi IgG anticardiolipina. Vedere l'etichetta della fila per i range GPL previsti.

**Controllo positivo dell'anticorpo IgM anticardiolipina **CONTROL|+**:** numero di catalogo 7021-02M. Fiala contenente 1,5 ml di siero di controllo umano positivo anticardiolipina pronto all'uso. Questo siero contiene anticorpi IgM anticardiolipina. Vedere l'etichetta della fila per i range MPL previsti.



**Controllo negativo dell'anticorpo anticardiolipina **CONTROL|-**:** numero di catalogo 7031. Fiala contenente 2 ml di siero di controllo umano negativo anticardiolipina pronto all'uso. I valori GPL e MPL previsti sono al di sotto di 5,0 unità.



**Calibratore degli anticorpi IgG anticardiolipina **CAL**:** numero di catalogo 7026-02G. Fiala contenente 1,5 ml di siero di calibrazione positivo IgG umano anticardiolipina liquido, stabile, pronto all'uso. Vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi anticardiolipina nelle unità GPL.

**Calibratore degli anticorpi IgM anticardiolipina **CAL**:** numero di catalogo 7026-02M. Fiala contenente 1,5 ml di siero di calibrazione positivo IgM umano anticardiolipina liquido, stabile, pronto all'uso. Vedere l'etichetta della fiala per la concentrazione di anticorpi anticardiolipina nelle unità MPL.

**Reagente anticorpo enzimatico, specifico per IgG umane **CONJ|HRP**:** numero di catalogo 7009-02G (14 ml). Anti-IgG umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP). Il reagente è pronto per l'uso.

**Reagente anticorpo enzimatico, specifico per IgM umane **CONJ|HRP**:** numero di catalogo 7009-02M (14 ml). Anti-IgM umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP). Il reagente è pronto per l'uso.

**Soluzione di substrato **SOLN|SUB****   : numero di catalogo 7035 (14 ml). Soluzione di substrato enzimatica HRP-specifica, contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO:** Infiammabile. Questo reagente contiene meno del 25% di metanolo e acetone. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

**Reagente bloccante **SOLN|STOP****   : numero di catalogo 7033 (14 ml). Esclusivo reagente bloccante per sistemi di analisi EIA della Immuno Concepts. Il reagente è pronto per l'uso. **PERICOLO:** corrosivo. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori dalla portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

## COMPONENTI NON REATTIVI

### Supporto per micropozzetti

**Tampone PBS **PWDR|PBS**:** numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. Nei kit per analisi completi, per ogni piastra con 96 micropozzetti sono forniti due sacchetti di polvere tamponata.

**Preparazione:** sciogliere una bustina di polvere tamponata in un (1) litro di acqua deionizzata o distillata coprire, e conservati tra i 2-25°C, per massimo 4 settimane o fino a che non compaiono segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili. **NON AGGIUNGERE A QUESTO TAMPONE TWEEN 20 O ALTRI DETERGENTI.**

## ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche di precisione per l'erogazione di volumi da 10-1000 µl  
Flacone morbido per erogare la soluzione tampone di lavaggio nei micropozzetti o un sistema di lavaggio automatico per micropozzetti  
Contenitore da un litro per tampone di lavaggio PBS  
Acqua deionizzata o distillata  
Spettrofotometro per la lettura della piastra, capace di rilevare la misurazione dell'assorbanza a 450 nm  
Provette per preparare le diluizioni dei sieri  
Carta bibula o assorbente  
Pipettatrice multicanale in grado di erogare i volumi necessari in 8 pozzetti  
Guanti a perdere  
Timer da laboratorio

## PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodi approvati dalla FDA. Nessun metodo di analisi può garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, epatite C, epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i materiali del kit vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i sieri di controllo, i seri di calibrazione e i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante nei sieri di controllo e di calibrazione. Il sodio azide può reagire con le tubature in piombo o rame formando azoturi metallici altamente esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
4. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
5. Non inattivare a caldo i campioni di siero da usare per l'analisi anticardiolipina. L'inattivazione a caldo può causare l'aumento dei valori.
6. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
7. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.
8. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
9. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
10. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi. Durante l'analisi i campioni devono rimanere confinati nei micropozzetti.
12. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
13. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i pozzetti e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
14. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
15. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
16. Il reagente bloccante è corrosivo e può causare ustioni. Questo reagente contiene acidi cloridrico e solforico (meno del 3% ciascuno in volume), e deve essere maneggiato con cura. Tenere fuori della portata dei bambini. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico. Non aggiungere mai acqua a questo reagente.

## RACCOLTA DI CAMPIONI

**Raccolta:** il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

Immuno Concepts sconsiglia l'uso di plasma in questa analisi per la possibilità di contaminazione dello stesso con le piastrine. Le piastrine possono influenzare i risultati reagendo con gli anticorpi antifosfolipidi.

**ATTENZIONE:** *non inattivare a caldo i campioni di siero da usare per l'analisi anticardiolipina. L'inattivazione a caldo può causare l'aumento dei valori.*

**Sostanze interferenti:** non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati atipici. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

**Conservazione:** i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in freezer autosbrinatori.

**ATTENZIONE:** *il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.*

## NOTE PROCEDURALI GENERALI

1. Prima dell'uso è estremamente importante avere tutti i componenti del kit e i campioni di siero a temperatura ambiente (18-25°C). Per portare alla temperatura di 20°C un intero litro di tampone di lavaggio dopo averlo tolto dal frigo, possono essere necessarie parecchie ore. Temperature di incubazione superiori o inferiori al range stabilito possono essere causa di risultati non accurati. Dopo l'uso conservare al freddo campioni e reagenti non usati.
2. Mescolare bene i reagenti prima dell'uso capovolgendoli con delicatezza. Non far vorticare i reagenti e non scuoterli. Evitare la formazione di schiuma.
3. Quando si preparano le diluizioni dei campioni, le punte delle pipette devono essere asciugate prima di distribuire il siero nel diluente di quest'ultimo. L'eccesso di campione adesivo alla parte esterna della punta della pipetta influenza i risultati.
4. Si consiglia l'uso di una pipettatrice multicanale perché garantisce erogazione, tempi di incubazione e tempi di reazione più uniformi.
5. **Un adeguato lavaggio dei pozzetti è estremamente importante.** Pozzetti non lavati adeguatamente mostreranno valori di fondo alti e possono dare falsi valori positivi. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Far scorrere tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere queste fasi per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio. L'uso di un sistema di lavaggio automatico dei micropozzetti ne assicurerà il giusto lavaggio ed è consigliato.  
**NOTA:** a causa dei vari tipi di tecniche di lavaggio e di sistemi automatici, il numero dei lavaggi può essere adeguato in modo da ottenere risultati ottimali. Ciascun laboratorio deve decidere il numero di lavaggi più efficace per il proprio sistema di lavaggio.
6. Una inadeguata rimozione dei residui del tampone di lavaggio può causare un viraggio incoerente del colore. Per ridurre al minimo i residui di tampone di lavaggio, le strisce di micropozzetti devono essere passate con forza e tamponate su carta assorbente.
7. I tempi di tutte le fasi sono cruciali. Tutti i campioni di siero devono essere diluiti prima di iniziare la procedura e devono essere distribuiti nei micropozzetti nel minor tempo possibile (non più di cinque minuti). Le dimensioni dei lotti vanno fissate in modo che la manipolazione del campione possa essere realizzata comodamente entro questo lasso di tempo.
8. Con la sola eccezione dell'ultima incubazione (soluzione di substrato), ogni periodo di incubazione inizia con il completamento dell'erogazione del campione o del reagente. L'incubazione della soluzione di substrato deve durare esattamente 15 minuti per ciascun pozzetto. Tutti i campioni e i reagenti devono essere distribuiti con la stessa sequenza e a tasso costante.
9. Non usare Tween 20, Triton X-100 o altri detergenti nei tamponi di lavaggio o in altri reagenti usati in questa analisi.

# RISULTATI

## CALCOLI

1. Sottrarre il valore di assorbanza per il pozzetto in bianco delle IgG dal valore di assorbanza ottenuto nei pozzetti delle IgG di calibrazione, di controllo e dei campioni del paziente. Sottrarre il valore di assorbanza per il pozzetto in bianco delle IgM dal valore di assorbanza ottenuto nei pozzetti delle IgM di calibrazione, di controllo e dei campioni del paziente. Calcolare i valori di assorbanza medi per i pozzetti in duplicato.
2. Per ottenere il fattore di conversione, la concentrazione di anticorpi anticardiolipina del siero di calibrazione (indicata sull'etichetta) si divide per il valore medio di assorbanza dei pozzetti di calibrazione. Per le IgG e le IgM si calcolano fattori di conversione separati.
3. Per ottenere la concentrazione di anticorpi anticardiolipina in unità GPL o MPL i valori di assorbanza di ciascun campione si moltiplicano per il fattore di conversione.

## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

1. Il valore di assorbanza medio dei pozzetti di calibrazione deve essere almeno di 0,400.
2. Il pozzetto di controllo del bianco deve avere un valore di assorbanza inferiore a 0,150. Valori di assorbanza del bianco superiori a 0,150 indicano un lavaggio inadeguato o contaminazione dei reagenti.
3. I valori di anticorpi anticardiolipina ottenuti per i sieri di controllo positivi e negativi devono essere entro i range indicati sulle etichette. Questi range sono stati fissati per comprendere il 95% dei valori previsti per la variazione statisticamente normale. Sono previste piccole deviazioni occasionali al di fuori di questi range. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri criteri di accettazione/rifiuto sulla base della propria esperienza con questa analisi.
4. I campioni con valori di anticorpi anticardiolipina maggiori del limite superiore del calibratore devono essere refertati come positivi e i valori verranno denominati come "maggiore di" oppure "uguale a" rispetto al valore indicato sull'etichetta del calibratore.
5. Il fattore di conversione deve essere calcolato per ogni sequenza. L'uso del fattore di conversione di un'altra sequenza o lo scambio dei fattori di conversione GPL e MPL invaliderà i risultati.
6. Ciascun laboratorio deve stabilire e conservare i propri valori del range di riferimento (normali) sulla base del gruppo di pazienti e di altri fattori locali. Come esempio, consultare "Caratteristiche prestazionali, specificità cliniche".

# VALORI ATTESI

## RANGE DI RIFERIMENTO

Il significato clinico degli anticorpi anti-cardiolipina è ancora oggetto di indagine. La maggioranza dei ricercatori ritiene comunque che bassi livelli di anticorpi anti-cardiolipina non abbiano un significato clinico determinante (17, 18).

Sulla base dei risultati di test eseguiti internamente (vedere "Caratteristiche di performance") e tenendo in considerazione che pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi in genere hanno livelli di anticorpi anticardiolipina da moderati ad alti (17) Immuno Concepts suggerisce i seguenti range di riferimento:

- Livello alto = oltre 80 unità GPL o MPL
- Livello moderato = da 20 a 80 unità GPL o MPL
- Livello normale = meno di 20 unità GPL o MPL

Si suggerisce a ciascun laboratorio di stabilire i propri range di riferimento.

## PREVALENZA DI ANTICORPI PREVISTA

Numerosi studi hanno dimostrato l'associazione degli anticorpi anticardiolipina al lupus eritematoso sistemico (1, 7, 8, 11-16). In questi studi, la prevalenza di anticorpi IgG anticardiolipina va dal 23% al 54% (media 41,4%), e la prevalenza di anticorpi IgM anticardiolipina dal 5% al 41% (media 25,5%). Le differenze tra la prevalenza osservata tra i diversi studi sono forse dovute ai criteri di scelta dei pazienti, al gruppo di pazienti studiati o ai livelli di anticorpi considerati significativi. Il sistema di analisi degli anticorpi anticardiolipina della Immuno Concepts fu usato per analizzare i campioni di siero di 58 pazienti visitati per consulto reumatologico. Questo gruppo di pazienti fu selezionato per patologie reumatiche cliniche, ma non per specifici stati patologici né per storie trombotiche. In questo gruppo, 56 campioni (96,6%) erano negativi per gli anticorpi IgG anticardiolipina (27 campioni con meno di 5 unità GPL e 29 campioni nel range 5-20 GPL), due campioni (3,4%) avevano livelli moderati di anticorpi IgG anticardiolipina e nessun campione aveva alti livelli di anticorpi IgG anticardiolipina. Un campione (1,7%) era positivo per gli anticorpi IgM anticardiolipina a livello moderato.

# LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base dei titoli dell'anticorpo anticardiolipina. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.

2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi anticardiolipina. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Se il paziente è negativo per gli anticorpi anticardiolipina, ma i dati clinici suggeriscono la presenza di anticorpi antifosfolipidi, alcuni ricercatori raccomandano di fare un'analisi per il lupus anticoagulante come conferma dei risultati anticardiolipina negativi. Se i risultati dell'anticorpo anticardiolipina o del lupus anticoagulante sono positivi, il paziente è considerato positivo per gli anticorpi antifosfolipidi (1).
4. I pazienti con infezioni di sifilide sierologicamente positive possono mostrare un risultato positivo per gli anticorpi anticardiolipina. In genere si considera che questi pazienti non hanno un accresciuto rischio trombotico come si vede in pazienti affetti da patologie reumatiche con anticorpi anticardiolipina. Nel sistema di analisi degli anticorpi IgG e IgM anticardiolipina RELISA<sup>®</sup> della Immuno Concepts furono analizzati diciassette pazienti con sifilide serofast (FTA-Abs e/o MHA-TP positivi) attiva confermata. Dodici di questi campioni (70,6%) erano positivi per anticorpi IgG anticardiolipina e tre (17,6%) erano positivi per anticorpi IgM anticardiolipina oltre a quelli IgG. La diagnosi di sifilide va confermata o esclusa con specifiche analisi degli anticorpi antitreponemici.
5. Durante molte infezioni possono presentarsi anticorpi anticardiolipina passeggeri. Se l'analisi del paziente è positiva mentre sono presenti segni clinici di infezione, l'analisi va ripetuta dopo che l'infezione si è risolta.
6. Il fattore reumatoide può interferire con le analisi in fase solida per gli anticorpi IgM, portando a falsi risultati positivi.
7. In studi pubblicati di pazienti con lupus eritematoso sistemico, la prevalenza di anticorpi IgG anticardiolipina è stata riportata in un range tra il 23% e il 54%, e la prevalenza di anticorpi IgM anticardiolipina tra il 5% e 41% dei pazienti.
8. Il significato clinico degli anticorpi anticardiolipina è ancora oggetto di indagine. I livelli di anticorpi rilevati con questo sistema di analisi non indica necessariamente la gravità o la durata della patologia.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### SPECIFICITÀ CLINICA

**Controlli normali:** furono testati campioni di siero di 330 donatori di sangue sani usando il sistema di test di analisi degli anticorpi anticardiolipina della Immuno Concepts. In questo gruppo, 327 (99,1%) erano negativi (246 campioni meno di 5 unità GPL e 81 campioni nel range 5-20 GPL), 3 (0,9%) avevano un livello moderato di anticorpi IgG anticardiolipina e nessuno aveva un livello alto di anticorpi IgG anticardiolipina. All'analisi per IgM 329 (99,7%) erano negativi (318 campioni meno di 5 unità MPL e 11 campioni nel range 5-20 MPL), uno (0,3%) aveva un livello moderato di anticorpi IgM anticardiolipina e nessuno dei campioni aveva un livello alto di anticorpi IgM anticardiolipina.

**Controlli della patologia reumatica:** nel sistema di analisi degli anticorpi anticardiolipina della Immuno Concepts furono analizzati campioni di siero di venti pazienti affetti da patologie reumatiche diverse da SLE e senza alcuna storia di episodi trombotici. Nessuno questi campioni era positivo per gli anticorpi IgG o IgM anticardiolipina.

### SENSIBILITÀ CLINICA

Il sistema di analisi degli anticorpi anticardiolipina della Immuno Concepts fu usato per analizzare i campioni di siero di 58 pazienti visitati per consulto reumatologico. Questo gruppo di pazienti fu selezionato per patologie reumatiche cliniche, ma non per specifici stati patologici né per storie trombotiche. In questo gruppo, 56 campioni (96,6%) erano negativi per gli anticorpi IgG anticardiolipina (27 con meno di 5 unità GPL e 29 nel range 5-20 GPL), due campioni (3,4%) avevano livelli moderati di anticorpi IgG anticardiolipina e nessun campione aveva alti livelli di anticorpi IgG anticardiolipina. Un campione (1,7%) era positivo per gli anticorpi IgM anticardiolipina a livello moderato.

Questi stessi campioni furono analizzati con un metodo anticardiolipina di riferimento ELISA che trovò anticorpi IgG anticardiolipina negli stessi due campioni e anticorpi IgM anticardiolipina nello stesso campione singolo. Quindi il sistema Immuno Concepts dimostrò una sensibilità e una specificità del 100% per gli anticorpi IgG e IgM anticardiolipina in confronto al metodo di riferimento.

Nel sistema di analisi degli anticorpi anticardiolipina della Immuno Concepts furono analizzati campioni di siero di 32 pazienti con patologie reumatiche diverse da SLE, e una storia di almeno un episodio trombotico. Sette di questi campioni avevano anticorpi IgG anticardiolipina a livello moderato. Oltre agli anticorpi IgG anticardiolipina, un campione aveva anticorpi IgM anticardiolipina a livello moderato.

### PRECISIONE

Otto campioni con valori noti di anticorpi IgG anticardiolipina furono saggiati in nove diverse occasioni. Il coefficiente di variazione (CV) tra le analisi per questi campioni andava dal 6,4% al 10,4% (media 9,2%), e il CV tra le analisi per i valori GPL da 1,9% a 10,0% (media 8,7%).

Otto campioni con valori noti di anticorpi IgM anticardiolipina furono saggiati in nove diverse occasioni. Il coefficiente di variazione (CV) tra analisi per valori di assorbanza andavano da 8,0% a 10,0% (media 8,7%), e il CV tra analisi per i valori MPL da 6,1% a 10,0% (media 7,7%).

Due campioni noti come positivi per anticorpi IgG anticardiolipina e due noti come positivi per anticorpi IgM anticardiolipina furono analizzati in dieci replicati ciascuno. Il risultati del coefficiente di variazione (CV) tra analisi per questi campioni sono riportati nella Tabella 1.

**TABELLA 1**

Campione	Livello di anticardiolipina	CV tra analisi (ass.)	CV tra analisi (unità)
IgG positivo basso	13 unità GPL	2,4%	5,1%
IgG positivo moderato	70 unità GPL	9,6%	7,1%
IgM positivo basso	9 unità MPL	5,0%	11,5%
IgM positivo moderato	25 unità MPL	9,5%	7,0%

### GUARIGIONE

Due campioni con livelli GPL noti, uno basso e l'altro moderato, vennero diluiti con parti uguali di standard contenenti quantitativi noti di anticorpi IgG anticardiolipina. I dati calcolati, osservati e di guarigione sono presentati nella Tabella 2.

**TABELLA 2**

Campione	GPL calcolato	GPL osservato	Guarigione (%)
Positivo basso	-	9,0	-
Positivo basso +10	10	11,0	110
Positivo basso +20	14,5	14,3	99
Positivo basso +40	24,5	25,3	103
Positivo basso +60	34,5	35,7	103
Positivo moderato	-	54,0	-
Positivo moderato +10	32,0	32,3	101
Positivo moderato +20	37,0	38,1	103
Positivo moderato +40	47,0	46,4	99
Positivo moderato +60	57,0	57,7	101

Due campioni con livelli MPL noti, uno basso e l'altro moderato, vennero diluiti con parti uguali di standard contenenti quantitativi noti di anticorpi IgM anticardiolipina. I dati calcolati, osservati e di guarigione vengono presentati nella Tabella 3.

**TABLE 3**

Campione	GPL calcolato	GPL osservato	Guarigione (%)
Positivo basso	-	8,0	-
Positivo basso +5	7,5	7,3	97
Positivo basso +10	9,0	9,2	102
Positivo basso +20	14,0	14,3	102
Positivo basso +30	19,0	18,8	99
Positivo moderato	-	25,0	-
Positivo moderato +5	15,0	14,5	97
Positivo moderato +10	17,5	17,9	103
Positivo moderato +20	22,5	22,1	98
Positivo moderato +30	27,5	27,8	101

# RIFERIMENTI

- 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. Immunol. 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.
- Wilson, W. A., Gharavi, A.E., Koike, T., Lockshin, M.D., Branch, D.W., Piette, J.C., Brey, R., Derksen, R., Harris, E.N., Hughes, G.R., Triplett, D.A., and Khamashta, M.A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arth. Rheum. 42:1309-1311, 1999.
- Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H.W.M., de Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Kriolis, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 4:295-306, 2006.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea



Limitazione Di  
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le  
istruzioni per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 7096-02-I,

4.11.02.003.099-It

Rev 5.2

© Copyright 2016



# PROCEDURA DI ANALISI IN CARDIOLIPIN IgG e IgM RELISA®

**Prima dell'uso tutti i campioni, i reagenti (compresa la soluzione tampone di lavaggio) e i micropozzetti devono essere a temperatura ambiente.**

- 1. PREPARAZIONE DEL MODULO DI PROTOCOLLO**  
Indicare nel modulo di protocollo accluso nel kit la posizione dei campioni nei micropozzetti. Un pozzetto viene usato come bianco del reagente per analisi IgG ed un secondo pozzetto viene usato come bianco del reagente per analisi IgM. Raccomandiamo di analizzare in duplicato ciascun campione del paziente, il calibratore e il controllo per gli anticorpi IgG e IgM anticardiolipina fino a che non si sia stabilita una precisione accettabile per l'analisi nel proprio laboratorio.
- 2. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO (PBS)**  
Sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere coperto e conservato a 2-25°C fino a quattro settimane.
- 3. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**  
Diluire i campioni del paziente a 1:100 aggiungendo 10 µl di siero a 990 µl di diluente per campioni. Mescolare bene. I controlli e il calibratore sono forniti alla diluizione di lavoro e non ne richiedono una ulteriore.
- 4. PREPARAZIONE DEI MICROPOZZETTI**  
Rimuovere i micropozzetti necessari dalle rispettive buste e metterli nel supporto. I micropozzetti devono essere saldamente sistemati nel supporto. Premere con forza su entrambe le estremità delle strisce in modo che stiano ben ferme nel supporto. Se si usano pozzetti singoli o meno di una striscia completa di pozzetti, assicurarsi che ogni pozzetto sia ben fermo. I pozzetti ben sistemati nel supporto non cadono quando il supporto viene capovolto. Se per l'analisi sono necessari meno di otto pozzetti, questi possono essere separati staccandoli. Le strisce non utilizzate possono essere rimesse nel sacchetto con essiccate provvisto di un'apposita chiusura a zip per sigillarlo e refrigerate fino a 45 giorni.
- 5. EROGAZIONE DELLE DILUIZIONI DEL SIERO**  
Erogare 100 µl dei calibratori, dei controlli e dei campioni dei pazienti nei pozzetti appropriati come descritto nel modulo di protocollo. Erogare 100 µl di diluente per campioni nel pozzetto bianco del reagente.
- 6. INCUBAZIONE DEI MICROPOZZETTI (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione i pozzetti devono essere protetti da correnti d'aria o variazioni di temperatura. I pozzetti possono essere eventualmente coperti con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerli dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 7. LAVAGGIO DEI MICROPOZZETTI (consultare le note procedurali generali 5 e 6)**  
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Far scorrere tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere queste fasi per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
- 8. EROGAZIONE DEL REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO**  
Erogare 100 µl di reagente anticorpo IgG enzimatico in ciascun pozzetto per il bianco delle IgG, il calibratore GPL, i controlli IgG e i campioni di IgG dei pazienti. erogare 100 µl di reagente anticorpo enzimatico IgM in ciascun pozzetto per il bianco delle IgM, il calibratore MPL, i controlli IgM e i campioni di IgM dei pazienti.
- 9. INCUBAZIONE DEI MICROPOZZETTI (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Durante l'incubazione i pozzetti devono essere protetti da correnti d'aria o variazioni di temperatura. I pozzetti possono essere eventualmente coperti con nastro trasparente o con carta assorbente per proteggerli dalla polvere o da altri corpi estranei.
- 10. LAVAGGIO DEI MICROPOZZETTI**  
Lavare i pozzetti da 3 a 5 volte con soluzione di lavaggio tampone PBS. Per il lavaggio manuale, aspirare il contenuto dei pozzetti, poi riempirne ciascuno con soluzione tampone di lavaggio. Evitare la contaminazione incrociata dei pozzetti, particolarmente nel primo lavaggio dopo l'aspirazione. Far scorrere tutto il tampone di lavaggio dai pozzetti capovolgendoli, poi eliminare i residui con un brusco movimento "secco" del polso. Ripetere queste fasi per 3-5 lavaggi in tutto. I pozzetti devono poi essere passati con forza su carta assorbente o altro materiale assorbente in modo da eliminare ogni traccia di residuo di tampone di lavaggio.
- 11. EROGAZIONE DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO**  
Usando un timer per assicurare intervalli coerenti, erogare 100 µl di soluzione substrato in ciascun pozzetto. La soluzione substrato deve essere aggiunta a tasso regolare in modo che ciascun pozzetto sia incubato esattamente per lo stesso tempo (15 minuti). La soluzione substrato nei pozzetti incubati con campioni positivi virerà al blu e la soluzione nei pozzetti incubati con campioni negativi sarà da incolore a blu molto chiaro.
- 12. INCUBAZIONE DEI MICROPOZZETTI (15 minuti esatti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**  
Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti. Durante l'incubazione i pozzetti devono essere protetti da correnti d'aria o variazioni di temperatura.
- 13. EROGAZIONE DEL REAGENTE BLOCCANTE**  
Dopo che il primo pozzetto è stato incubato per 15 minuti esatti, aggiungere 100 µl di reagente bloccante nello stesso ordine e allo stesso tasso con cui era stato aggiunto ai pozzetti la soluzione substrato. Al momento dell'aggiunta del reagente bloccante, la soluzione di substrato blu vira al giallo e quella incolore resta incolore.
- 14. LETTURA DELL'ASSORBANZA DEI POZZETTI**  
Entro 30 minuti dall'aggiunta del reagente bloccante, i pozzetti devono essere letti in uno spettrofotometro per la lettura della piastra. I pozzetti vengono letti a 450 nm rispetto al pozzetto del bianco del reagente. Se è disponibile uno spettrofotometro a lunghezza d'onda doppia, la lunghezza d'onda per il filtro di riferimento deve essere 600-650 nm. La lettura dei micropozzetti a 450 nm senza filtro di riferimento avrà come risultato valori di assorbanza più alti.

**PER ASSISTENZA TECNICA:** +1-916-363-2649  
oppure a mezzo e-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

