



RELISA[®] KARDIOLIPIN IgG- IgM-ANTIKROPPTEST

För Diagnostisk Användning In Vitro

För yrkesmässigt bruk

Katalognummer: 7096-02 (96 brunnarna) och 7696-02 (576 brunnarna)

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett enzymimmunanalystestsystem (EIA) för detektion och mätning av IgG- och IgM-antikroppar mot kardiolipin i humanserum. Detta testsystem skall användas som hjälpmedel vid utvärdering av risken för trombotiska rubbningar hos personer med systemisk lupus erythematosus eller lupusliknande syndrom.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antifosfolipida antikroppar, bland annat antikardiolipinantikroppar, detekteras ofta i sera från patienter med systemisk lupus erythematosus (1). Flera rapporter har associerat dessa autoantikroppar med olika trombotiska rubbningar i venerna och artärerna, inklusive hjärninfarkt (2), djup ventrombos (3), trombocytopeni (1), lungemboli (4) och återkommande missfall med placentainfarkt (5). "Lupusantikoagulanten" (6), en substans som förlänger det aktiverade partiella tromboplastintestet *in vitro*, har också associerats med dessa kliniska syndrom, även om den inte är identisk med antikardiolipinantikroppen. Termerna "lupus antikoagulant" och "antifosfolipida antikroppar" används ibland felaktigt som synonymer, trots att dessa immunoglobuliner inte är desamma (1).

Immuno Concepts testsystem är en enzymanalys av mikrobrunnar för detektion av antikardiolipinantikroppar i humanserum. Det har nyligen visat sig att immunanlys i fast fas är en ytterst känslig och specifik metod för detektion av antikardiolipinantikroppar (7-10) Immuno Concepts testsystem har standardiserats med hjälp av ett internationellt erkänt referenspreparat, som erhållits från Antiphospholipid Standardization Laboratory, "Harris Standards" (9). De objektiva resultat som erhållits i denna analys rapporteras som GPL-enheter för IgG-antikardiolipinantikroppar och som MPL-enheter för IgM-antikardiolipinantikroppar.

TESTPRINCIP

Detta test är en indirekt EIA. Mikrobrunnarnas yta har täckts med ett stabiliserat preparat av kardiolipin som fungerar som antigen i detta system. Kalibratorserum, kontroller och spädda patientprover placeras i mikrobrunnarna och odlas så att antikardiolipinantikropparna i provet reagerar med antigenen i den fasta fasen. Efter tvättning för att avlägsna obunden antikropp och annat seraprotein odlas brunnarna med antihumana IgG- eller antihumana IgM-antikroppar märkta med pepparrotperoxid. Två pepparrotperoxidaskonjugerade framställningar av antikroppar ingår i detta testsystem. En av dessa är specifik för human IgG och den andra för human IgM. Koncentrationerna av IgG- och IgM-antikardiolipinantikroppar måste fastställas separat med hjälp av dessa två konjugat.

Om resultaten är positiva efter inkubation med pepparrotperoxidaskonjugat bildas ett stabilt komplex i tre delar. Detta komplex består av antihuman antikropp konjugerad med pepparrotperoxid bunden till human antikardiolipinantikropp, vilken i sin tur är bunden till den kardiolipin som stabiliserats på plastytan.

Efter ännu ett tvättsteg detekteras detta komplex genom tillsättande av en lösning av tetrametylbensidin (TMB) och H₂O₂ som kromogent substrat. Graden av färgutveckling i varje brunn står i relation till koncentrationen av antikardiolipinantikroppar i respektive serumprov. Varje mikrobrunn avläses i spektrofotometer och resultaten erhålls genom jämförelse av kalibratorbrunnarnas absorbering med provbrunnarnas.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM MEDFÖLJER

Förvaring: Alla komponenter skall kylförvaras i 2-10°C. Får ej frysas.

Stabilitet: Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd inte komponenterna efter utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Kardiolipin kotade mikrotiterbrunnar på strips: Katalognummer 7008-01. En mikrotiter ram innehåller tolv strips med åtta brunnar på varje strips, kotade med en stabiliserad blandning av diphosphatidylglycerol (cardiolipin) från bovin hjärta. Om färre än åtta brunnar skall användas för testning går det bra att bryta loss resterande brunnar och lägga tillbaka dessa i foliepåsen samt återsluta denna. I kylskåpstemperatur kan man då förvara dessa upp till 45 dagar.

Provspädningsvätska: Katalognummer 7100 (100 ml). Patentskyddad buffrad provspädningsvätska för spädning av patientprover. Denna spädningsvätska innehåller komplementet apolipoprotein H.

Positiv kontroll mot antikardiolipinantikropp: Katalognummer 7021-02G. Bruksfärdig ampull innehållande 1,5 ml positivt humankontrollserum av antikardiolipin. Detta serum innehåller både IgG-antikardiolipinantikroppar. Se ampullens etikett för uppgift om förväntade GPL-intervall.

Positiv kontroll mot antikardiolipinantikropp: Katalognummer 7021-02M. Bruksfärdig ampull innehållande 1,5 ml positivt humankontrollserum av antikardiolipin. Detta serum innehåller både IgM-antikardiolipinantikroppar. Se ampullens etikett för uppgift om förväntade MPL-intervall.

Negativ kontroll av antikardiolipinantikropp: Katalognummer 7031-01. Bruksfärdig ampull innehållande 2 ml negativt humankontrollserum av antikardiolipin. Förväntade GPL- och MPL-intervall ligger under 5,0 enheter.

Kalibrator till IgG antikardiolipinantikropp: Katalognummer 7026-02G. Bruksfärdig ampull innehållande 1,5 ml flytande stabilt kalibratorserum av IgG antikardiolipin. Se ampullens etikett för uppgift om koncentration av antikardiolipinantikropp i enheterna GPL.

Kalibrator till IgM antikardiolipinantikropp: Katalognummer 7026-02M. Bruksfärdig ampull innehållande 1,5 ml flytande stabilt kalibratorserum av IgM antikardiolipin. Se ampullens etikett för uppgift om koncentration av antikardiolipinantikropp i enheterna MPL.

Enzymantikroppreagens - human IgG-specifik: Katalognummer 7009-02G (14 ml). Getantihuman IgG konjugerad med pepparrotperoxid (HRP). Reagensen är bruksfärdig.

Enzymantikroppreagens - human IgM-specifik: Katalognummer 7009-02M (14 ml). Getantihuman IgM konjugerad med pepparrotperoxid (HRP). Reagensen är bruksfärdig.

Substratlösning: Katalognummer 7035 (14 ml). HRP-specifik enzymsubstratlösning innehållande 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) och väteperoxid (H₂O₂). Reagensen är bruksfärdig.

Stoppreagens: Katalognummer 7033 (14 ml). Patentskyddad stoppreagens för Immuno Concepts EIA-testsystem. Reagensen är bruksfärdig. VARNING: Frätande. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra vid ögonen i samband med hantering skall du omedelbart spola noggrant med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten till denna reagens.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

Hållare för mikrobrunnar

PBS-buffert: Katalognummer 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0.2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge en liter. Två påsar med buffertpulver levereras för varje 96-mikrofordjupningsplatta i kompletta testsatser.

Framställning: Lös upp en påse buffertpulver i en liter avjoniserat eller destillerat vatten och förvara avkylt i 2-10°C i upp till fyra veckor, eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar. TILLSÄTT INTE TWEEN 20 ELLER ANDRA RENGÖRINGSMEDEL TILL DENNA BUFFERT.

ÖVRIGT MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

Volymetriska precisionspipetter för pipettering av 10-1000 µl volymer

Klämflaska för pipettering av tvättbuffertlösning till mikrobrunnar eller till ett automatiserat tvättsystem för mikrobrunnar

Enlitersbehållare för PBS-tvättbuffert

Avjoniserat eller destillerat vatten

Plattläsningspektrometer som kan avläsa absorption vid 450 nm

Provrör för att bereda serumspädningar

Läskapper eller pappershanddukar

Multikanalspipett som kan pipettera till 8 brunnar

Engångshandskar

Laboratorietidur

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts i denna produkt har testats med FDA-godkända metoder och visat sig reagera negativt (inte upprepat reaktivt) på antikroppar mot humant immunbristvirus-1 (HIV-1), humant immunbristvirus-2 (HIV-2), hepatit C-virus (HCV) och hepatit B ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer HIV-1, HIV-2, hepatit-C, hepatit-B, eller andra smittämnen. Därför skall allt material hanteras som potentiellt smittsamt.
2. Alla kontrollsera, kalibratorsera och patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitutets manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel i kontrollen och kalibratorserat. Natriumazid kan reagera med ledningsrör av bly eller koppar och bilda högexplosiva metallazider. När reagenser kasseras skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att skölja bort eventuella rester i avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
4. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
5. Värm inte upp inaktiva serumprov som skall användas för antikardiolipintester. Värmeinaktivering kan ge förhöjda värden.
6. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
7. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.
8. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prov eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
11. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat. Proverna måste hela tiden hållas instängda i mikrobrunnarna under analysen.
12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
13. Placera alla reagenser, mikrobrunnar och prov i rumstemperatur (18-24°C) före användning.
14. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
15. Mikrobiell kontamination av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
16. Stoppreagensen är frätande och kan orsaka brännskador. Denna reagens innehåller hydrokloriska och svavelhaltiga syror (mindre än 3 % vardera per volym) och skall hanteras med varsamhet. Förvaras utom räckhåll för barn. Om du råkar röra ögonen vid hantering skall du omedelbart spola med vatten och kontakta läkare. Tillsätt aldrig vatten i denna reagens.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-24°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys. Immuno Concepts rekommenderar inte att plasma används i denna analys, eftersom det finns risk att plasman kontamineras med trombocyter. Trombocyter kan påverka resultaten genom att reagera med antifosfolipidantikroppar.

WARNING: Värm inte upp inaktiva serumprover som skall användas för antikardiolipintester. Värmeinaktivering kan ge förhöjda värden.

Störande substanser: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi eller mikrobiell tillväxt skall inte användas, eftersom dessa förhållanden kan leda till avvikande resultat. Prov som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före analys.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10°C under högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare, skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande fryslagerum.

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprov kan ge falskt positiva eller negativa resultat.

ALLMÄNNA PROCEDURANVISNINGAR

1. Det är ytterst viktigt att alla satskomponenter och serumprov står i rumstemperatur (18-24°C) före användning. En hel liter tvättbuffert kan ta flera timmar att värma till 20°C sedan den har tagits ur kylskåpet. Inkubationstemperaturer som ligger högre eller lägre än det angivna intervallet kan leda till inexakta resultat. Sätt tillbaka oanvända prover och reagenser i kylförvaring efter användning.
2. Blanda reagenserna väl före användning genom försiktig inversion. Snurra eller rotera inte reagenserna. Undvik skumning.
3. När provspädningarna bereds skall pipettspetsarna torkas av innan serum dispenserar i provspädningen. Överflödigt prov som sitter fast på utsidan av pipettspetsen påverkar resultaten.
4. Vi rekommenderar att en multikanalspipett används eftersom detta ger mer enhetliga reagensdispenseringar, inkubationstider och reaktionstider.
5. **Det är ytterst viktigt att brunnarna tvättas ordentligt.** Otillräckligt tvättade brunnar leder till höga bakgrundsvärden och kan ge falskt positiva resultat. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa dessa steg för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättbuffert. Om du använder det automatiserade tvättsystemet för mikrorunnar blir brunnarna konsekvent tvättade, varför detta rekommenderas.
OBSERVERA: Då det finns olika tvätteknycktyper och automatiserade program kan antalet tvättar behöva justeras för optimala resultat. Varje laboratorium bör fastställa det mest effektiva antalet tvättar för sitt tvättsystem.
6. Om den resterande tvättbufferten inte avlägsnas ordentligt kan detta leda till ojämn färgutveckling. Mikrorunnarsremsorna skall knackas hårt mot och läskas på absorberande papper eller handdukar för att minimera resterande tvättbuffert.
7. Det är mycket viktigt alla steg sker i rätt tid. Alla serumprover skall spädas innan proceduren påbörjas och de måste dispenserar till mikrorunnarna på så kort tid som möjligt (högst än fem minuter). Batchstorlekarna skall väljas så att provhanteringen går så smidigt som möjligt under denna tidsperiod.
8. Med undantag för den sista inkubationen (substratlösningen) börjar varje inkubationstid med att prov eller reagenser dispenserar. Inkubationen av substratlösningen måste vara exakt 15 minuter för varje brunn. Alla prover och reagenser skall dispenserar i samma ordningsföljd och med konstant hastighet.
9. Använd inte Tween 20, Triton X-100 eller andra rengöringsmedel i tvättbuffertar eller andra reagenser som används i denna analys.

RESULTAT

BERÄKNINGAR

1. Subtrahera absorptionsvärdet för IgG-ämnesbrunnen från de absorptionsvärden som erhållits för IgG-kalibrator-kontroll- och patientprovbrunnarna. Subtrahera absorptionsvärdet för IgM-ämnesbrunnen från de absorptionsvärden som erhållits för IgM-kalibrator-, kontroll- och patientprovbrunnarna. Beräkna de genomsnittliga absorptionsvärdena för dubbla brunnar.
2. Koncentrationen av antikardiolipinantikropp i kalibratorserat (står angivet på etiketten) divideras med medelabsorptionsvärdet för kalibratorbrunnarna för att erhålla konverteringsfaktorn. Separata konverteringsfaktorer beräknas för IgG och IgM.
3. Absorptionsvärdena för varje prov multipliceras med konverteringsfaktorn för att få fram koncentrationen av antikardiolipinantikropp i enheterna GPL och MPL.

KVALITETSKONTROLL

1. Kalibratorbrunnarnas genomsnittliga absorptionsvärde måste vara minst 0,400.
2. Ämneskontrollbrunnen skall ha ett absorptionsvärde som är mindre än 0,150. Ämnesabsorptionsvärden större än 0,150 tyder på otillräcklig tvättning eller kontamination av reagenser.

- De antikardiolipinantikroppvärden som erhålls för positiva och negativa kontroller måste ligga inom de intervall som anges på etiketterna. Dessa intervall har upprättat så att de omfattar 95% av de värden som förväntades på grund av statistisk normal variation. Ibland kan små avvikelser förväntas uppstå utanför dessa områden. Varje laboratorium bör upprätta sina egna kriterier för godtagbara respektive ej godtagbara värden grundat på hur förtrogna de är med denna analys.
- Antikardiolipinantikroppnivåernas kliniska signifikans håller fortfarande på att undersökas. Prover med antikardiolipin antikroppar som är större än den övre gränsen av kalibratoren borde visas positiva med ett enhetsvärde "större eller lika med" enhetsvärdet som visas på etiketten på kalibrator serumet.
- Konverteringsfaktorn måste beräknas för varje serie. Resultaten blir ogiltiga om en konverteringsfaktor från en annan serie används, eller om GPL- och MPL-konverteringsfaktorerna byts ut mot varandra.
- Varje laboratorium bör upprätta och underhålla sina egna referensintervall (normalvärden) baserat på patientpopulationen och andra lokala faktorer. Se "Prestanda, klinisk specificitet" som ett exempel.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

REFERENS OMFATTNING

Den kliniska innebörden av antikardiolipin antikroppar är fortfarande i undersökning. De flesta utredarna håller med om att den kliniska innebörden av att hitta låga värden av antikardiolipin antikroppar är icke avgörande.

Baserat på resultatet av våra tester (se "Karaktäristiska Framföranden"), har patienter med Antiphospholipid Syndrom ofta förhöjt värde av antikardiolipin antikroppar (17), Immuno Concepts rekommenderar därför följande referens nivåer.

Hög nivå = Över 80 GPL eller MPL enheter
 Måttlig nivå = 20 till 80 GPL eller MPL enheter
 Normal nivå = Mindre än 20 GPL eller MPL units

Det är rekommenderat att varje laboratorium utför en normal studie för att fastslå referens nivåer.

FÖRVÄNTAD FÖREKOMST AV ANTIKROPPAR

Många studier har påvisat ett samband mellan antikardiolipinantikroppar och systemisk lupus erytematosus (1, 7, 8, 11-16). I dessa studier ligger förekomsten av IgG-antikardiolipinantikroppar mellan 23 och 54 procent (medelvärde 41,4%) och den allmänna förekomsten av IgM-antikardiolipinantikroppar mellan 5 och 41 procent (medelvärde 25,5%). Skillnaderna i förekomsten i dessa studier beror troligen på kriterierna för patienturval, vilka patientpopulationer som studerats samt vilka antikroppnivåer som har ansetts vara signifikanta. Immuno Concepts testsystem för antikardiolipinantikropp användes för att testa serumprover från 58 patienter som sökte läkare för reumatologiska sjukdomar. Denna patientpopulation valdes på grund av kliniskt reumatiska sjukdomar och inte för något speciellt sjukdomstillstånd eller tidigare trombotiska sjukdomar. I denna population reagerade 56 prover (96,6%) negativt på IgG-antikardiolipinantikroppar (27 prover hade färre än 5 GPL-enheter och 29 prover låg i området 5-20 GPL), två prover (3,4%) uppvisade medelhög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Inget prov hade hög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Ett prov (1,7%) reagerade positivt på IgM-antikardiolipinantikroppar på medelhög nivå.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

- Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av antikroppnivåer för antikardiolipinantikropp. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens tidigare sjukdomar och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
- Behandling skall inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antikardiolipinantikroppar. Kliniska indikationer, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan behandling påbörjas.
- Om patienten reagerar negativt på antikardiolipinantikroppar, men de kliniska resultaten tyder på förekomst av antifosfolipidantikroppar, rekommenderar vissa forskare analys av lupusantikoagulant för att bekräfta de negativa antikardiolipinresultaten. Om varken antikardiolipinantikropp- eller lupusantikoagulantresultaten är positiva, betraktas patienten som positiv för antifosfolipidantikroppar (1).
- Patienter med serologiskt positiva syfilisinfektioner kan uppvisa positiv reaktion på antikardiolipinantikroppar. Sådana patienter anses i allmänhet inte löpa större risk för trombos, till skillnad från patienter med reumatisk sjukdom och antikardiolipinantikroppar. 17 prover från patienter med bekräftad aktiv eller serumfast syfilis (FTA-Abs och/eller MHA-TP-positiv) testades med Immuno Concepts testsystem RELISA® Cardiolipin IgG- och IgM-antikropp. Tolv (70,6%) av dessa prover reagerade positivt på IgG-antikardiolipinantikroppar och tre (17,6%) reagerade förutom på IgG-antikropparna även positivt på IgM-antikardiolipinantikroppar. Diagnosen syfilis skall bekräftas eller uteslutas genom specifika antitreponemala antikroppanalyser.

5. Antikardiolipinantikroppar kan förekomma tillfälligt under många infektioner. Om en patient testas positivt samtidigt som det finns kliniska tecken på infektion, skall testet upprepas när infektionen har gått tillbaka.
6. Reumatoid faktor kan störa de fasta fasanalyserna för IgM-antikropp, vilket leder till falskt positiva resultat.
7. I publicerade studier av patienter med systemisk lupus erythematosus har allmän förekomst av IgG-antikardiolipinantikroppar rapporterats ligga inom området 23-54 procent, medan förekomst av IgM-antikardiolipinantikroppar har rapporterats hos 5-41 procent patienter.
8. Den kliniska signifikansen av antikardiolipinantikroppar håller fortfarande på att undersökas. De antikroppnivåer som detekteras med detta testsystem anger inte sjukdomens svårighetsgrad eller varaktighet.

PRESTANDA

KLINISK SPECIFICITET

Normala kontroller: Serumprover från 330 friska bloddonatorer testades med hjälp av Immuno Concepts testsystem antikardiolipinantikropp. I denna grupp var 327 prover (99,1%) negativa (246 prover hade färre än 5 GPL-enheter och 81 prover låg inom området 5-20 GPL), tre prover (0,9%) hade en medelhög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Inget prov uppvisade hög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Vid analys av IgM var 329 prover (99,7%) negativa (318 prov hade färre än 5 MPL-enheter och 11 prover låg inom området 5-20 MPL), ett prov (0,3%) hade en medelhög nivå av IgM-antikardiolipinantikroppar. Inget prov uppvisade hög nivå av IgM-antikardiolipinantikroppar.

Reumatiska sjukdomskontroller: Serumprover från 20 patienter med andra reumatiska sjukdomar än SLE och inga tidigare trombotiska sjukdomar testades med Immuno Concepts testsystem för antikardiolipinantikropp. Inget av dessa prover reagerade positivt på varken IgG- eller IgM-antikardiolipinantikroppar.

KLINISK SENSITIVITET

Immuno Concepts testsystem för antikardiolipinantikropp användes för att testa serumprover från 58 patienter som sökte läkare för reumatologiska sjukdomar. Denna patientpopulation valdes på grund av kliniskt reumatiska sjukdomar och inte för något speciellt sjukdomstillstånd eller tidigare trombotiska sjukdomar. I denna population reagerade 56 prover (96,6%) negativt på IgG-antikardiolipinantikroppar (27 prov hade färre än 5 GPL-enheter och 29 prov låg inom området 5-20 GPL), två prover (3,4%) hade en medelhög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Inget prov uppvisade hög nivå av IgG-antikardiolipinantikroppar. Ett prov (1,7%) reagerade positivt på IgM-antikardiolipinantikroppar på medelhög nivå.

Samma prover testades med en referens-ELISA-antikardiolipinmetod som detekterade IgG-antikardiolipinantikroppar i samma prover och IgM-antikardiolipinantikroppar i samma enstaka prov. Därmed uppvisade Immuno Concepts system 100% sensitivitet och 100 % specificitet för både IgG-antikardiolipinantikroppar och IgM-antikardiolipinantikroppar jämfört med referensmetoden.

Serumprover från 32 patienter med SLE och minst en tidigare trombotisk sjukdom testades med Immuno Concepts testsystem för antikardiolipinantikropp. Sju av dessa prover hade IgG-antikardiolipinantikroppar på medelhög nivå. Förutom IgG-antikardiolipinantikropparna uppvisade ett prov även IgM-antikardiolipinantikroppar på medelhög nivå.

PRECISION

Åtta prover med kända antikardiolipin-IgG-antikroppvärden analyserades vid nio olika tillfällen. Interanalysens variationskoefficient (CV) för dessa prover låg mellan 6,4 och 10,4 procent (medelvärde 9,2%) och interanalysens CV för GPL-värdena låg mellan 1,9 och 10,0 procent (medelvärde 8,7%).

Åtta prover med kända antikardiolipin-IgM-antikroppvärden analyserades vid nio olika tillfällen. Interanalysens variationskoefficient (CV) för dessa provers absorptionsvärden låg mellan 8,0 och 10,0 procent (medelvärde 8,7%) och interanalysens CV för MPL-värdena låg mellan 6,1 och 10,0 procent (medelvärde 7,7%).

Två prover som reagerat positivt på IgG och två prover som reagerat positivt på IgM-antikardiolipinantikroppar analyserades i vardera tio replikat. Intraanalysens variationskoefficient- (CV) resultat för dessa prov framgår av nedanstående Tabell 1.

TABELL 1

Prov	Antikardiol.nivå	Intraanalys-CV (abs)	Intraanalys-CV (enheter)
Låg-IgG-positivt	13 GPL-enheter	2,4%	5,1%
Medelhög-IgG-positivt	70 GPL-enheter	9,6%	7,1%
Låg-IgM-positivt	9 MPL-enheter	5,0%	11,5%
Medelhög-IgM-positivt	25 MPL-enheter	9,5%	7,0%

ÅTERHÄMTNING

Två prover med kända GPL-nivåer, en låg och den andra medelhög, späddes med lika standarddelar med kända mängder av IgG-antikardiolipinantikroppar. Beräknade, observerade och återhämtade data framgår av nedanstående Tabell 2.

TABELL 2

Prov	Beräknad GPL	Observerad GPL	Återhämtning (%)
Låg-positivt	-	9,0	-
Låg-positivt +10	10	11,0	110
Låg-positivt +20	14,5	14,3	99
Låg-positivt +40	24,5	25,3	103
Låg-positivt +60	34,5	35,7	103
Medelhög-positivt	-	54,0	-
Medelhög-positivt +10	32,0	32,3	101
Medelhög-positivt +20	37,0	38,1	103
Medelhög-positivt +40	47,0	46,4	99
Medelhög-positivt +60	57,0	57,7	101

Två prover med kända MPL-värden, ett lågt och det andra medelhögt, späddes med lika standarddelar med kända mängder av IgM-antikardiolipinantikroppar. Beräknade, observerade och återhämtade data framgår av nedanstående tabell 3.

TABELL 3

Prov	Beräknad MPL	Observerad MPL	Återhämtning (%)
Låg-positivt	-	8,0	-
Låg-positivt +5	7,5	7,3	97
Låg-positivt +10	9,0	9,2	102
Låg-positivt +20	14,0	14,3	102
Låg-positivt +30	19,0	18,8	99
Medelhög-positivt	-	25,0	-
Medelhög-positivt +5	15,0	14,5	97
Medelhög-positivt +10	17,5	17,9	103
Medelhög-positivt +20	22,5	22,1	98
Medelhög-positivt +30	27,5	27,8	101

BIBLIOGRAFI

- 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., McCrea, 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., Kritis, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 4:295-306, 2006.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsföpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant europeiska unionen



Temperatur begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



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

Cat 7096-02-I,

4.11.02.003.099-Sv

Rev 4.0 © Copyright 2011

IVD-direktiv (2001/59/EG) riskfraser



REF 7035: Substratlösning

R23/ 24/ 25	Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R39/ 23/ 24/ 25	Giftigt: risk för mycket allvarliga bestående hälsoskador vid inandning, hudkontakt och förtäring.
S1/2	Förvaras i låst utrymme och oåtkomligt för barn.
S7	Förpackningen förvaras väl tillsluten.
S36/ 37	Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar.
S45	Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

RELISA® KARDIOLIPIN IgG-IgM ANTIKROPPTESTPROCEDUR

Alla proerv och reagenser (inklusive tvättbuffertlösningen) och mikrobrunnarna måste stå i rumstemperatur före användning.

1. LORDNINGSTÄLLANDE AV ARBETSBLAD

Märk det arbetsblad som medföljer satsen för att ange var proven skall stå i mikrobrunnarna. En brunn används som reagensämne för IgG-analyserna och en andra brunn som ett reagensämne för IgM-analyser. Vi rekommenderar att varje patientprov, kalibrator och kontroll för både IgG- och IgM-antikardiolipinantikroppar analyseras två gånger tills en godtagbar precision för laborieprovet har upprättats.

2. REKONSTITUTION AV TVÄTTBUFFERT (PBS)

Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. Den fosfatbuffrade saltlösningen kan täckas och förvaras i 2-10°C i högst fyra veckor.

3. SPÄDNING AV PROV

Späd patientproverna 1:100 genom tillsättande av 10 µl serum till 990 µl provspädningsvätska. Blanda väl. Kontrollerna och kalibratorm levereras färdigspädda och kräver ingen ytterligare spädning.

4. FÖRBERED MIKROTITERBRUNNAR

Ta bort det begärda antalet mikrotiter strips från påsen och placera dem i ramhållaren. Mikrotiter stripsen måste fästas stadigt i ramhållaren. Tryck bestämt ner i båda ändarna av stripsen så de säkert fäster i ramhållaren. Vid bruk av individuella brunnar eller mindre än en hel strip med brunnar bör du vara säker på att varje brunn sitter riktigt på plats. Brunnar som är ordentligt på plats i ramhållaren trillar inte ut när ramhållaren är omvänd. Om mindre än 8 brunnar behövs för testet kan brunnen delas genom att knäppa dem itu. Oanvända brunnar kan förvaras i foliepåsen förseglad och kylt i upp till 45 dagar.

5. DISPENSERING AV SERUMSPÄDNINGAR

Dispensera 100 µl av kalibratorema, kontrollerna och patientproven i lämpliga brunnar (se arbetsblad). Dispensera 100 µl provspädningsvätska i reagensämnesbrunnen.

6. INKUBATION AV MIKROBRUNNAR (trettio minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)

Odla i rumstemperatur i 30 minuter. Brunnarna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Brunnarna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem från damm och andra främmande ämnen.

7. TVÄTTNING AV MIKROBRUNNAR (se "Allmänna proceduranvisningar" 5 och 6)

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa detta för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan bestämt knackas mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättlösning.

8. DISPENSERING AV ENZYMTANTIKROPPEAGENS

Dispensera 100 µl anti-IgG enzymantikroppreagens i var och en av brunnarna för IgG-ämnet, GPL-kalibratorm, IgG-kontrollerna och IgG-patientproven. Dispensera 100 µl anti-IgM enzymantikroppreagens i var och en av brunnarna för IgM-ämnet, MPL-kalibratorm, IgM-kontrollerna och IgM-patientproven.

9. INKUBATION AV MIKROBRUNNAR (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-24°C)

Odla i rumstemperatur i 30 minuter. Brunnarna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden. Brunnarna kan om så önskas täckas med genomskinlig tejp eller pappershandduk för att skydda dem från damm eller andra främmande ämnen.

10. TVÄTTNING AV MIKROBRUNNAR

Tvätta brunnarna tre till fem gånger med PBS tvättbuffertlösning. Manuell tvätt: Aspirera brunnarnas innehåll och fyll därefter varje brunn med tvättbuffertlösning. Undvik korskontamination mellan brunnarna, särskilt i första tvätten efter aspirationen. Töm all tvättlösning från brunnarna genom att vända dem upp och ned och skaka därefter resterande tvättbuffert från brunnarna med en bestämd "knyck" med handleden. Upprepa detta för totalt tre till fem tvättar. Brunnarna skall sedan knackas bestämt mot en pappershandduk eller annat absorberande material för att avlägsna alla spår av kvarvarande tvättlösning.

11. DISPENSERING AV SUBSTRATLÖSNING

Förvissa dig om jämna intervaller med hjälp av ett tidur och dispensera 100 µl substratlösning i varje brunn. Substratlösningen måste tillsättas i brunnarna i jämn hastighet så att varje brunn inkuberas exakt lika länge (15 minuter). Substratlösningen i brunnar som inkuberas med positiva prover blir blå, medan lösningen i brunnar som inkuberas med negativa prover blir färglösa till mycket svagt blå.

12. INKUBATION AV MIKROBRUNNAR (exakt 15 minuter i rumstemperatur, dvs 18-24°C)

Odla i rumstemperatur i exakt 15 minuter. Brunnarna skall skyddas mot drag och temperaturväxlingar under inkubationstiden.

13. DISPENSERING AV STOPPREAGENS

När den första brunnen har inkuberats i exakt 15 minuter, skall 100 µl stoppreagens tillsättas i varje brunn, i samma ordningsföljd och med samma hastighet som substratlösningen tillsattes i brunnarna. När stoppreagensen tillsätts skiftar den blå substratlösningen till gult, medan den färglösa lösningen förblir färglös.

14. LÄSNING AV BRUNNARNAS ABSORPTION

Brunnarna måste avläsas i en plattläsande spektrofotometer inom 30 minuter efter tillsättande av stoppreagensen. Brunnarna avläses vid 450 nm mot reagensämnesbrunnen. Om spektrofotometer med dubbla våglängder används skall referensfiltrets våglängd vara 600-650 nm. Avläsning av mikrobrunnarna vid 450 nm utan referensfilter ger högre absorptionsvärden.

TEKNISK SUPPORT: +1-916- 363-2649
eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

