

MBL

CE

MESACUP Cardioliipin TEST

Cat. No. 7300E: 96 wells
Cat. No. 7300E: 96 puits
Art.-Nr. 7300E: 96 Auftragsstellen
Cat. No. 7300E: 96 pocillos
Cat. n. 7300E: 96 pozzetti
Cat. N° 7300E: 96 ποços
Αρ. Κατ. 7300E: 96 βυθισμάτων

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

5-10 Marunouchi 3 chome, Naka-ku, Nagoya, 460-0002 Japan

Tel: +81 52-971-2081 Fax : +81 52-971-2337 URL <http://www.mbl.co.jp>

- CONTENTS -
- CONTENU -
- INHALTSVERZEICHNIS -
- CONTENIDO -
- CONTENUTI -
- CONTENDO -
- ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ -

English	1
Français	
Deutsch	9
Español	
Italiano	17
Português	
Ελληνικά	
Symbols/Symboles/Symbole/Símbolos/Simboli/ Simbolos/Σύμβολα/	26

English

INTENDED USE

The MESACUP Cardioliipin TEST is the quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti Cardioliipin antibodies in human serum. The MESACUP Cardioliipin TEST is intended for in vitro diagnostic use as an aid in the determination of certain autoimmune diseases.

SUMMARY AND EXPLANATION

As well as biologically false positive serologic tests for syphilis (BFP) and lupus anticoagulant (LAC), anti-Cardioliipin antibodies are one of the anti-phospholipid antibodies. This antibody reacts with cardioliipin or complex composed of cardioliipin and cofactor (ex.β₂ glycoprotein 1) in human or animal sera. These antibodies are associated with thrombosis, organ infarct, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. To describe patients who show the common features to these diseases, Hughes, Harris et al. introduced the new concept termed "anticardioliipin syndrome" in 1986. At present, it is widely recognized as "anti-phospholipid antibody syndrome". Anti-Cardioliipin antibodies can be measured by RIA or ELISA method. Since there were various methods and reference samples used to measure these antibodies in many laboratories, Harris's ELISA method were standardized in the International Work shop of 1986.

The MESACUP Cardioliipin TEST is for measuring with high sensitivity, anti-Cardioliipin antibodies present in the sera by ELISA.

PRINCIPLE

The MESACUP Cardioliipin TEST measures anti-Cardioliipin antibodies present in the serum by ELISA. Standards and patient sera are added to microwell coated with Cardioliipin, allowing anti-Cardioliipin antibodies to react with the immobilized antigen (Sample incubation). After wash to remove any unbound serum proteins, horseradish peroxidase conjugated anti human IgG monoclonal antibody is added and incubated (Conjugate incubation). Following another washing step, the peroxidase substrate is added and incubated for an additional period of time (Substrate incubation). Acid solution is then added to each well to terminate the enzyme reaction and to stabilize the color development. The assay can be quantified by measuring the reaction photometrically and plotting the results.

BRIEF ASSAY PROCEDURE

<Sample incubation>	Add 100 µl of diluted sample (1:101) to each well of microwell plate
(20-25°C) 60 min.	↓
	Wash
	↓
<Conjugate incubation>	Add 100 µl of conjugate solution to each well
(20-25°C) 60 min.	↓
	Wash
	↓
<Substrate incubation>	Add 100 µl of substrate to each well
(20-25°C) 30 min	↓
	Add 100 µl of stop solution to each well

↓
Read absorbance
↓
Interpretation of result

REAGENTS AND STORAGE

1) MICROWELL STRIPS

96 wells MICROWELLS STRIPS (8 x 12 wells) coated with Cardioliipin as antigen, the strips packaged in a strip holder and sealed in a foil envelope with desiccant, are stable at 2-8°C until the labeled expiration date.

2) Anti-Cardioliipin STANDARD SERUM (6 standards)

One vial containing 1.5 ml each of anti-Cardioliipin antibody positive human serum, PBS, bovine serum, 0.09% sodium azide. Anti-Cardioliipin concentration of each standard is on each label. Ready to use-make no further dilution. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

3) CONJUGATE REAGENT (101X)

One vial containing 0.3 ml of horseradish peroxidase conjugated mouse anti-human IgG (γ chain specific) monoclonal antibody, HEPES, Proclin 150 and BSA as 101X concentrate. Stable at 2-8 °C until labeled expiration date.

4) CONJUGATE DILUET*

One bottle containing 24ml of HEPES, Ptoclin 150 and BSA.

5) ASSAY DILUENT*

Two bottles containing 50mL of PBS, bovine serum, and 0.09% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

6) WASH CONCENTRATE (10X) *

One 100 ml bottle containing sodium dihydrogen phosphate, sodium chloride and Tween 20 as a 10X concentrate. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

7) SUBSTRATE SOLUTION*

One 20 ml bottle containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide (TMB/ H_2O_2). Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

8) STOP SOLUTION*

One 20 ml bottle containing 1N Sulfuric acid. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

9) POSITIVE CONTROL SERUM

One vial containing 1.5 ml of anti-Cardioliipin antibody positive human serum with 0.09% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

10) NEGATIVE CONTROL SERUM

One vial containing 1.5 ml of anti-Cardioliipin antibody negative human serum with 0.09% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

*Those reagents can also be used for MESACUP Cardioliipin IgM.

PRECAUTIONS

- (1) This product is for in vitro diagnostic use only.
- (2) Do not use kit components beyond the stated expiration dates.
- (3) Avoid contact of reagents with eyes, skin and clothing. Reagents on skin must be washed away with plenty of water. TMB contains irritant and Stop Solution consists of a 1N sulfuric acid, which is a poison and corrosive.
- (4) Standards, Positive and Negative Controls are derived from human serum, in which HBs antigen, HCV antibody HIV-1 and HIV-2 antibodies has not been detected. No test method, however, can guarantee the absence of these or any other infectious agents. These reagents and all patient samples should be handled as if they are capable of transmitting AIDS, hepatitis or any other infectious diseases.
- (5) Standards, Positive Control, Negative Control and Assay Diluent contain sodium azide (0.09%) as a preservative and must be handled with caution - do not ingest or allow contact with skin or mucous membranes. Sodium azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush with plenty of water when disposing materials containing sodium azide into a drain.
- (6) Some kit components contain animal origin materials, which are from non-infectious animals. These components, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (7) Matching lot numbers of Microwell strips, Standards must be used together in the assay. Do not substitute reagents from other kits.
- (8) All reagents must be brought to room temperature (20 -25°C) before starting the assay.
- (9) Do not expose the kit to direct sun during assay and storage.
- (10) Avoid microbial and cross contamination of reagents or samples.
- (11) Incubation temperatures above or below normal room temperature (20-25°C), shorter or longer time periods of incubation and inaccurate dilution may give erroneous results.
- (12) The wells must be rinsed with Wash Solution properly enough to avoid false positive.
- (13) Carefully pipette not to foam each sample and reagent to avoid cross contamination between microwells.
- (14) All microwell strips, which are not immediately required, should be returned to the zip lock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.
- (15) Wash concentrate may become turbid at 2-8°C, which does not cause inconsistent results.
- (16) Implement used for the test should be disposed or treated as shown below.

Soak in 2% final conc. glutaraldehyde solution for more than 1 hour or soak in 0.5% Sodium hypochlorite solution (available chlorine: approx. 5000ppm) for more than 1 hour or autoclave at 121°C for more than 20 minutes.
- (17) The Cardioliipin antibodies value obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedure.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader (wavelength: 450 nm, 620 nm/reference)

- Multichannel micropipette (e.g. 100 μ l - 300 μ l) for dispensing conjugate, substrate, and stop solution.
- Single channel pipette (10 μ l & 100 μ l)
- Reagent reservoir
- Autowasher or wash bottle
- Deionized or distilled water
- One liter graduated cylinder for preparation of wash solution
- Test tubes for patient sample dilutions (e.g. 1000 μ l)
- Disposable pipette tips
- Paper towels
- Basin and disinfectant
- Microplate cover

PROCEDURE

■ PREPARATION OF REAGENTS

- Bring all assay materials to room temperature (20-25 °C) prior to use.
- Microwell Strips: Remove required microwell strip from pouch and place them in the frame. Promptly return unused strips to refrigerated storage.
- Wash Solution: Prepare 1: 10 dilution of The Wash Concentrate prior to use.(ex. add 100 ml of Wash Concentrate to 900 ml of distilled water). The diluted wash solution is stable for 2 weeks at 2 -8°C.
- Conjugate Solution: The conjugate reagent must be diluted prior to use. Dilute Conjugate Reagent 1: 100 with Conjugate Diluent. (ex. add 0.1mL of Conjugate Reagent to 9.9mL of Conjugate Diluent.)
- Do not dilute Standards, Negative Control, Positive Control, Assay Diluent, Substrate and Stop Solution, which are ready-to-use.

■ PREPARATION OF SAMPLES

- Dilute each patient serum 1:101 by adding 10 μ l of serum to 1mL of Assay Diluent.
 - *Diluted samples must be used within a day.
 - *Diluted samples can be also used for MESACUP Cardioliipin IgM.
- Use fresh patient sera. If storage is needed, they should be frozen below -20°C for up to one month, below -70°C for longer storage. Do not repeat freezing and thawing.
 - *In case stored below -20°C for more than 6 months or freezing and thawing repeatedly, nonspecific results are obtained because of IgG denaturation.

■ ASSAY PROCEDURE

STEP 1. (SAMPLE INCUBATION)

Using the multi-channel pipetor, transfer 100 μ l of Standards, each diluted sample, Positive and Negative Controls into the appropriate microwells of the antigen test plate.

- * Incubation starts on pipetting to the antigen-coated microwells. Pipetting should be completed as quickly as possible.

Cover wells with a plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25 °C).

STEP 2. (WASHING)

Aspirate or discard the well contents. Fill the well with Wash Solution and then completely aspirate or discard the contents. Wash 4 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining Wash Solution. When autowasher is used, wash 4 times.

* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set-up.

* Wash Solution should be used at 20-25 °C.

STEP 3. (CONJUGATE INCUBATION)

Pour Conjugated Reagent into a reservoir. Add 100 µl of the Conjugated Reagent to each well with multichannel pipette. Cover wells with the plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 4. (WASHING)

Wash the microplate following the STEP 2 procedure.

STEP 5. (SUBSTRATE INCUBATION)

Pour Substrate into a reservoir and pipette 100 µl of the Substrate to each well with multichannel pipette.

* The reservoir should be different from the one, which was used for pouring conjugate solution. A new disposable reservoir should be used because Substrate is easily oxidized by metal ion.

* The Substrate, once poured in a reservoir, should not be returned to the bottle.

Cover wells with the plate sealer and incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 6. (STOP REACTION)

Pour Stop Solution into a reservoir. Pipette 100 µl of the solution to each well with multichannel pipette.

■ READING

Read the absorbance of each well at 450 nm. If a dual wave length plate reader is available, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

* Reading should be done as quickly as possible after stopping the reaction.

* Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading the plate.

■ CALCULATION OF RESULT

Calculate the mean absorbance value of each standard and plot against log standard concentration on suitable graph paper. The concentration of the samples can then be read from the standard curve. Alternatively a suitable computer and curve-fitting program may be used.

*The assay is standardized by reference to the standard product (unit: GPL) for ELISA method established by E. Nigel Harris et al.

■ QUALITY CONTROL

Each assay result should meet the following criteria

A₄₅₀ of anti-Cardiolipin Standard-1: ≤ 0.09

A₄₅₀ of anti-Cardiolipin Standard-6: 1.0 – 2.0

The Positive and Negative Controls must give the following results:

	Positive Control	Negative Control
Anti-Cardiolipin value (U/ml)	≥20	<10

If any of these are not met, the results are invalid and the test should be repeated.

Before repeating assay, check the following procedure.

- Incubation Temperature
- Incubation Period of Time

- Washing

* When the quantitative value exceeds 120U/ml, it should be interpreted as greater than 120U/ml or the test must be repeated after diluting the sample.

TEST INTERPRETATION AND EXPECTED VALUES

The following is intended only as a guide for interpretation. Each laboratory is recommended to establish its own criteria for test interpretation based on sample populations typically encountered.

Anti-Cardiolipin value	Interpretation
< 10 U/ml	Negative for anti-Cardiolipin Ab
Greater than or equal to 10 U/ml	Positive for antiCardiolipin Ab

* When the MESACUP Cardiolipin TEST assayed serum samples from 205 healthy donors, the maximum value of 95.0% tile is less than 10 U/ml.

■ LIMITATIONS

As with other diagnostic test procedures, the results obtained with the MESACUP Cardiolipin TEST serve only as an aid to diagnosis and should not be interpreted as diagnostics in themselves.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

■ CLINICAL SPECIFICITY AND SENSITIVITY

Disease	Positive sample	Positive rate
APS	84/112	75.0%
SLE	94/213	44.1%
ITP	9/19	47.4%
Other diseases	47/252	18.7%
Normal Serum	10/205	4.9%

APS: anti-phospholipid antibody syndrome

SLE: systemic lupus erythematosus

ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura

■ PRECISION

Repeatability was demonstrated by testing 3 samples in sextuple. Reproducibility was determined by testing 3 samples on 5 different days (day-to-day) and by testing 3 samples in 3 lots (lot-to-lot). %CV values for reproducibility and repeatability were below 15% for each sample.

■ ASSAY RANGE

The assay range of this kit is up to 120 U/ml.

■ INTERFERING SUBSTANCES

Intrafat (more than 1.5%) , Ascorbic Acid (more than 30mg/ml), Hemoglobin (more than 600 mg/dl) and/or Bilirubin (more than 8.0mg/dl) may be affective on the assay result. Avoid using highly hemolysed samples or highly lipemic samples.

REFERENCES

1. Harris E.N., et al: Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin EXP. Immunol* 68: 215-222 (1987)
2. Hughes G.R.V., et al: The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheumatol.* 13: 486-489 (1986)

Français

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

MESACUP Cardioliipin TEST ist ein quantitativer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Cardioliipin in Humanserum. Der MESACUP Cardioliipin TEST dient zum Einsatz in-vitro als Hilfestellung bei der diagnostischen Abklärung gewisser Autoimmunerkrankungen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Autoantikörper gegen Cardioliipin zählen neben dem Lupus-Antikoagulant (LAC) und den serologischen Syphilis-Testen zu den Phospholipid-Antikörpern. Dieser Autoantikörper reagiert mit Cardioliipin oder einem Cardioliipin-Cofaktorkomplex (z.B. β_2 Glykoprotein 1) in menschlichen und tierischen Seren. Die Autoantikörper stehen in einem Zusammenhang mit einem Komplex aus u.a. Thrombosen, Infarkten, habituellen Aborten und Thrombozytopenie. Für Patienten mit diesen Krankheitskomplex prägten Hughes, Harris et al. 1986 den Begriff „Anti-Cardioliipin-Syndrom“. Heutzutage ist es allgemein unter dem Begriff „Anti-Phospholipid-Syndrom“ bekannt. Cardioliipin-Antikörper werden mittels RIA oder ELISA bestimmt.

Seit einem Internationalen Workshop 1986 gilt der Harris ELISA als Referenzmethode.

MESACUP Cardioliipin TEST ist ein sehr empfindlicher ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Cardioliipin in Humanserum.

TESTPRINZIP

Mit MESACUP Cardioliipin TEST werden Antikörper gegen Cardioliipin in Serum mittels ELISA bestimmt. Die Standards und Patientenserum werden den mit Cardioliipin beschichteten Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte hinzugefügt. Im Folgenden reagieren die Antikörper mit dem Cardioliipin-Antigen an der Festphase (Probeninkubation). Nach einem Waschschrift, zur Entfernung nicht gebundener Serumproteine, werden mit Meerrettichperoxidase markierte monoklonale Mausantikörper gegen Human-IgG hinzugefügt. Im Folgenden reagieren sie mit den an der Festphase gebundenen Cardioliipin-Antikörpern (Konjugatinkubation). Nach einem zweiten Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat hinzugefügt. Es folgt die Substratinkubation. Dann wird Säure in die Vertiefungen gegeben, um die Enzymreaktion abzustoppen und die Farbentwicklung zu stabilisieren. Anschließend werden die Vertiefungen photometriert und die Ergebnisse in quantitativen Einheiten ermittelt.

KURZFASSUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

	In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte
	100 μ l verdünnte Probe (1:101) hinzufügen
<Probeninkubation>	
(20-25 °C) 60 Min.	↓
	Waschen
	↓
<Konjugatinkubation>	In jede Vertiefung 100 μ l Konjugat geben
(20-25°C) 60 Min.	↓

Waschen
 ↓
 <Substratinkubation> In jede Vertiefung 100 µl Substrat geben
 (20-25 °C) 30 Min. ↓
 In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung geben
 ↓
 Photometrieren
 ↓
 Ergebnisse auswerten

REAGENZIEN UND IHRE LAGERUNG

1) MIKROTITERSTREIFEN

12 Mikrotiterstreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit Cardiolipin-Antigen. Die Streifen mit Halterahmen sind in einem Folienbeutel mit Trockenmittel verpackt. Sie sind bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen können nicht benötigte Streifen im wieder versiegelten Beutel bei 2-8 °C für 60 Tage gelagert werden.

2) Anti-Cardiolipin STANDARD SERUM (6 Standards)

Jedes Fläschchen enthält 1,5 ml Humanserum, positiv für Cardiolipin-Antikörper, PBS, Rinderserum und 0,09% Natriumazid. Der Antikörpergehalt steht auf dem Fläschchenetikett. Gebrauchsfertig. Darf nicht verdünnt werden. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

3) KONJUGAT (101x)

Jedes Fläschchen enthält 0,3 ml mit Meerrettichperoxidase markierte monoklonale Mausantikörper gegen Human-IgG (γ -Ketten-spezifisch), HEPES, Proclin 150 und BSA. Konzentrat (101x). Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

4) KONJUGATDILUENT*

Eine Flasche (24 ml) mit HEPES, Proclin 150 und BSA. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

5) PROBENDILUENT*

Zwei Flaschen (50 ml) mit PBS, Rinderserum und 0,09% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

6) KONZENTRIERTE WASCHLÖSUNG (10X) *

Eine Flasche (100 ml) mit Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid und Tween 20; Konzentrat (10x). Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

7) SUBSTRATLÖSUNG*

Eine Flasche (20 ml) mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid/Wasserstoffperoxid (TMB/H₂O₂). Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

8) STOPPLÖSUNG*

Eine Flasche (20 ml) mit 1 N Schwefelsäure. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

9) POSITIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 1,5 ml für Cardiolipin-Antikörper positivem Humanserum. Enthält 0,09% Natriumazid. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

10) NEGATIVES KONTROLLSERUM

Ein Fläschchen mit 1,5 ml Humanserum, Cardiolipin-Antikörper-negativ. Enthält 0,09% Natriumazid. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

*Diese Reagenzien können auch im MESACUP Cardiolipin IgM TEST verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur für *in-vitro* Diagnostik.
- (2) Die Bestandteile eines Testkits nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden.
- (3) Berührung der Reagenzien mit Augen, Haut und Bekleidung vermeiden. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser spülen. TMB ist ein Reizmittel und die Stopplösung enthält 1 N Schwefelsäure, einen giftigen und ätzenden Stoff.
- (4) Die Standards, positiven und negativen Kontrollseren sind aus Humanserum hergestellt, die mit negativem Ergebnis auf HBs-Antigen, HCV- sowie HIV 1 und HIV 2-Antikörper untersucht wurden. Indes kann kein Testverfahren gewährleisten, dass diese oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Diese Reagenzien und alle Patientenproben sollten daher so behandelt werden, als könnten sie AIDS, Hepatitis oder andere Infektionskrankheiten übertragen.
- (5) Die Standards, positiven und negativen Kontrollseren und der Probendiluent enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsstoff. Sie müssen mit Vorsicht behandelt werden. Nicht einnehmen und nicht mit Haut und Schleimhäuten in Berührung bringen. Natriumazid kann mit Kupfer- oder Bleirohren unter Ausbildung explosiver Metallazide reagieren. Falls Natriumazid-haltige Lösungen in den Ausguss entsorgt werden, sollte daher mit viel Wasser gespült werden.
- (6) Einige Bestandteile des Kits enthalten Materialien aus nicht-infizierten Tieren. Trotzdem sollten diese Bestandteile als potentiell biogefährlich gehandhabt und entsorgt werden.
- (7) Nur die Mikrotiterstreifen zusammen mit den Standards aus Kits der gleichen Charge verwenden. Die Reagenzien aus unterschiedlichen Kits nicht gegenseitig austauschen.
- (8) Vor Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.
- (9) Während der Lagerung und Testdurchführung den Kit und seine Reagenzien vor der Sonne schützen.
- (10) Reagenzien und Proben vor Verunreinigung durch Mikroorganismen und gegenseitigen Kontakt schützen.
- (11) Entgegen den Empfehlungen in der Testanleitung veränderte Inkubationstemperaturen, Inkubationszeiten und Verdünnungen können die Ergebnisse verfälschen.
- (12) Die Vertiefungen müssen sorgfältig mit der Waschlösung gewaschen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.
- (13) Beim Pipettieren der Proben und Reagenzien Schaumbildung vermeiden, um einer Verschleppung auf benachbarte Vertiefungen vorzubeugen.
- (14) Nicht benötigte Mikrotiterstreifen müssen sofort wieder in den Folienbeutel gelegt und dieser sorgfältig versiegelt werden, damit kein Kondenswasser gebildet wird.

- (15) Das Waschlösungskonzentrat kann bei 2-8 °C trüb werden. Für die Ergebnisse ist das unerheblich.
- (16) Im Test benutzte Gefäße etc. sollten wie folgt behandelt werden:
- 1 Stunde in eine Glutaraldehyd-Lösung (2 % Endkonzentration) legen oder länger als 1 Stunde mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (verfügbarer Chlorgehalt ca. 5000 ppm) behandeln oder länger als 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren.
- (17) Die mit diesem Test ermittelten Cardioliipin-Antikörperspiegel sind nur als Hilfestellung zur Diagnosefindung zu betrachten. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss der Arzt die anamnestiche Erhebung, die Befunde der körperlichen Untersuchung und die Daten anderer diagnostischer Verfahren berücksichtigen.

BENÖTIGTE, ABER NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN

- Mikrotiterplatten Reader (Wellenlänge: 450 nm, 620 nm/Referenzfilter)
- Multikanalpipette (100 µl – 300 µl) zum Pipettieren von Konjugat, Substrat und Stopplösung.
- Pipette für 10 µl und 100 µl
- Gefäße für Reagenzien
- Waschgerät oder Spritzflasche
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Messzylinder (1 Liter) zur Herstellung der Waschlösung
- Röhrchen für die Probenverdünnungen (1000 µl)
- Einmal-Pipettenspitzen
- Papierhandtücher
- Schüssel und Desinfektionsmittel
- Klebefolie

TESTDURCHFÜHRUNG

■ HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

- Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen.
- Mikrotiterstreifen: Benötigte Streifen dem Folienbeutel entnehmen und im Halterahmen verankern. Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort wieder versiegeln und im Kühlschrank aufbewahren.
- Waschlösungskonzentrat 1:10 verdünnen (z.B. 100 ml Waschlösungskonzentrat in 900 ml Aqua dest. geben). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist 2 Wochen bei 2-8 °C haltbar.
- Konjugatlösung: Das Konjugat muss vor Gebrauch 1:100 mit dem Konjugatdiluent verdünnt werden (z.B. 0,1 ml Konjugat und 9,9 ml Konjugatdiluent).
- Standards, Negativkontrolle, Positivkontrolle, Probendiluent, das Substrat und Stopplösung sind alle gebrauchsfertig. Sie dürfen nicht verdünnt werden.

■ HERSTELLUNG DER PROBEN

- Die Patientenserum 1:101 verdünnen (z.B. 10 µl Serum in 1 ml Probendiluent pipettieren).
 - *Die verdünnten Seren müssen am selben Tag getestet werden.
 - *Die verdünnten Seren können auch im MESACUP Cardioliipin IgM TEST eingesetzt werden.
- Wenn möglich, sollten frisch gewonnene Patientenserum verwendet werden. Sie können bis zu einem Monat bei -20 °C oder länger bei -70 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
 - *Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder Lagerung bei -20 °C über einen längeren Zeitraum als 6

Monate kann die Ergebnisse verfälschen, weil IgG in den Proben denaturiert wird.

■ TESTABLAUF

1.SCHRITT (PROBENINKUBATION)

Von den Standards, verdünnten Patientenseren, positiven und negativen Kontrollseren jeweils 100 µl in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

- * Das Pipettieren sollte zügig durchgeführt werden, damit sich die Inkubationszeiten für die einzelnen Vertiefungen sich nicht allzu sehr unterscheiden.

Streifen mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.

2.SCHRITT (WASCHEN)

Inhalt in den Vertiefungen absaugen oder auskippen. Mit Waschlösung füllen und vollständig absaugen oder auskippen. Insgesamt viermal waschen. Abschließend Streifen gegen Papierhandtücher ausklopfen, um die letzten Reste an Waschlösung zu entfernen. Bei Einsatz eines automatischen Waschgeräts viermal waschen.

- * Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Waschzeiten und -bedingungen festlegt.
- * Die Waschlösung sollte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

3.SCHRITT (KONJUGATINKUBATION)

Gebrauchsfertige Konjugatlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren. Mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.

4.SCHRITT (WASCHEN)

Die Streifen wie im 2. SCHRITT beschrieben waschen.

5.SCHRITT (SUBSTRATINKUBATION)

Gebrauchsfertige Substratlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl in jede Vertiefung pipettieren.

- * Nicht die selbe Wanne wie jene für das Konjugat verwenden. Am besten eignet sich eine neue Einwegwanne, weil das Substrat leicht durch Metallionen oxidiert wird.
- * Ggf. in der Wanne übrig gebliebenes Substrat darf nicht in die Substratflasche zurückgeführt werden.

Mit Klebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.

6.SCHRITT (ABSTOPPEN)

Die Stopplösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µl in jede Vertiefung pipettieren.

■ PHOTOMETRIEREN

Die Extinktion jeder Vertiefung bei 450 nm messen. Bei Verwendung eines Photometers mit zwei Wellenlängen erfolgt die Extinktionsmessung bei 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm.

- *Die Vertiefungen sollten sofort nach dem Abstoppen photometriert werden.
- *Die Unterseite der Streifen muss sauber und trocken sein. Die Vertiefungen dürfen beim Photometrieren keine Luftblasen enthalten.

■ BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Den mittleren Extinktionswert der einzelnen Standards berechnen und gegen den Logarithmus der Standardkonzentration auf Millimeterpapier auftragen. Die Konzentration der Proben kann auf der Standardkurve abgelesen werden. Alternativ kann eine Standardkurve auch mit Hilfe eines entsprechenden

Programms per Computer gezeichnet und können die Proben ausgewertet werden.

- * Der Test ist am Harris-Standard kalibriert. Die quantitativen Ergebnisse werden in GPL-Einheiten erstellt.

■ QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testansatz müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

A_{450} vom anti-Cardiolipin Standard-1: $\leq 0,09$

A_{450} vom anti-Cardiolipin Standard-6: 1,0-2,0

Die positiven und negativen Kontrollseren müssen folgende Ergebnisse zeigen:

	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Anti-Cardiolipin-Wert (GPL/ml)	≥ 20	< 10

Wird einer dieser Werte nicht erreicht, sind die Ergebnisse ungültig. Der Testlauf sollte wiederholt werden. Ebe der Testlauf wiederholt wird, sind folgende Parameter der Testdurchführung zu überprüfen:

- Inkubationstemperatur
- Inkubationszeiten
- Waschverfahren
- * Liegt ein quantitatives Ergebnis über dem höchsten Standard (120 GPL/ml), so ist es als > 120 GPL/ml anzugeben oder sollte der Test mit einer höher verdünnten Probe wiederholt werden.

BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE UND ERWARTETE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur der Orientierung. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Grenzwerte auf der Grundlage der von ihm betreuten Patientenpopulationen erstellt.

Anti-Cardiolipin-Wert (GPL/ml)	Beurteilung
< 10	Negativ für Anti-Cardiolipin
≥ 10	Positiv für Anti-Cardiolipin

*205 Seren von Gesunden wurden untersucht. Der 95,0-Perzentilwert war <10 GPL/ml.

■ GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei anderen diagnostischen Verfahren, so sind die mit MESACUP Cardiolipin TEST ermittelten Ergebnisse nur eine Hilfestellung bei der Diagnostik und nicht diagnostisch an sich zu werten.

LEISTUNGSMERKMALE

■ KLINISCHE SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Erkrankung	Positive Proben	Positivrate
APS	84/112	75,0%
SLE	94/213	44,1%
ITP	9/19	47,4%
Andere Erkrankungen	47/252	18,7%
Normalkollektiv	10/205	5,0%
APS: anti-Phospholipid-Syndrom; SLE: systemischer Lupus erythematoses		
ITP: Idiopathische thrombozytopenische Purpura		

■ PRÄZISION

Zur Bestimmung der Präzision wurden 3 Proben in sechsfacher Bestimmung getestet: an 5 verschiedenen Tagen (Präzision von Tag zu Tag) und mit 3 verschiedenen Chargen (Präzision in der Serie). Die Werte der Variationskoeffizienten (% VK) lagen bei sämtlichen Proben unter 15%.

■ MESSBEREICH

Der Messbereich dieses Kits erstreckt sich bis 120 GPL/ml.

■ INTERFERENZEN

Intrafett (mehr als 1,5%), Ascorbinsäure (mehr als 30 mg/ml), Hämoglobin (mehr als 600 mg/dl) und / oder Bilirubin (mehr 8,0 mg/dl) können die Testergebnisse beeinträchtigen. Stark hämolytische und stark lipämische Proben sollten vermieden werden.

LITERATUR

1. Harris E.N., et al: Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. Clin EXP. Immunol 68: 215-222 (1987)
2. Hughes G.R.V., et al: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumatol. 13: 486-489 (1986)

Español

Italiano

USO PREVISTO

MESACUP Cardioliipin TEST è un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitativo per il rilevamento degli anticorpi anti- Cardioliipina nel siero umano. MESACUP Cardioliipin

TEST è previsto per uso diagnostico in vitro come supporto nella determinazione di particolari malattie autoimmuni.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi anti-Cardioliipina sono uno degli anticorpi anti-fosfolipidi, così come gli anticorpi biologicamente falsi positivi dei test sierologici per la sifilide e gli anticorpi anticoagulanti del lupus. Questi anticorpi reagiscono con la cardioliipina o con il complesso cardioliipina e cofattore (es. β_2 -glicoproteina 1) nel siero umano o animale. Sono associati a trombosi, infarto degli organi, aborti ricorrenti e trombocitopenia. Per descrivere l'insieme dei sintomi di queste malattie, Hughes, Harris et al. introdussero, nel 1986, il nuovo concetto di "sindrome cardioliipinica". Attualmente è largamente riconosciuta come "Sindrome dell'anticorpo anti-fosfolipidi".

Gli anticorpi anti-Cardioliipina possono essere determinati con metodica RIA o ELISA. Poiché molti sono i metodi e i campioni di riferimento utilizzati per determinare questi anticorpi nei vari laboratori, durante il Workshop Internazionale del 1986 è stato standardizzato il metodo ELISA di Harris. Questa metodica è adottata universalmente e i suoi standard sono utilizzati in circa 800 laboratori in tutto il mondo.

MESACUP Cardioliipin Test è il reagente per misurare, con metodo ELISA ad elevata sensibilità, gli anticorpi anti-Cardioliipina presenti nel siero.

PRINCIPIO

MESACUP Cardioliipin Test misura con metodo ELISA gli anticorpi anti-Cardioliipina presenti nel siero. I Controlli e i Sieri in esame vengono posti in pozzetti sensibilizzati con antigene Cardioliipina, consentendo agli anticorpi anti-Cardioliipina di reagire con l'antigene immobilizzato (Incubazione del Campione). Dopo un lavaggio per allontanare le proteine seriche non legate viene aggiunto un siero anti-IgG umane coniugato con perossidasi e viene effettuata un'incubazione (Incubazione del Coniugato). Dopo un secondo lavaggio viene aggiunta la miscela substrato-cromogeno per la perossidasi e lasciato incubare (Incubazione del Substrato). Viene poi aggiunta una soluzione acida a ciascun pozzetto per bloccare la reazione enzimatica e per stabilizzare lo sviluppo di colore. Il test può essere quantificato misurando fotometricamente la reazione e tracciando il grafico dei risultati.

BREVE DESCRIZIONE DEL METODO

<Incubazione del Campione>	Aggiungere 100 μ l di campione diluito (1:101) ad ogni pozzetto della piastra microtiter.
(20-25°C) 60 min.	↓
	Lavare
	↓
<Incubazione del Coniugato>	Aggiungere 100 μ l di Coniugato ad ogni pozzetto.
(20-25°C) 60 min.	↓
	Lavare

↓

<Incubazione del Substrato> Aggiungere 100µl di Substrato ad ogni pozzetto.
(20-25°C) 30 min.

↓

Aggiungere 100µl di Sol. bloccante ad ogni pozzetto.

↓

Leggere l'assorbanza

↓

Interpretare il risultato

REAGENTI E LORO CONSERVAZIONE

1) STRIPS DI POZZETTI MICROTITER

96 Pozzetti di piastre microtiter in Strips (8 x 12 pozzetti) coatati con antigene Cardiolipina.

Le strips frazionabili, contenute in un apposito alloggio e confezionate in busta di alluminio con materiale dessiccante, sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza segnalata.

Le strips mantengono la loro stabilità per 60 giorni se conservate a 2-8°C una volta aperta e correttamente richiusa la busta.

2) Anti Cardiolipina SIERO STANDARD (6 standards)

Flaconi contenenti ognuno 1.5ml di siero umano con anticorpi anti-Cardiolipina, PBS, siero bovino, 0.09% sodiazide. La concentrazione di anti-Cardiolipina di ogni standard è segnalata sull'etichetta. Pronto all'uso senza necessità di diluizione. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

3) CONIUGATO (101x)

Un flacone contenente 0.3ml di anticorpo di topo monoclonale anti IgG umane coniugato con horseradish perossidasi, HEPES, Proclin 150 e BSA, concentrato 101x .

Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

4) DILUENTE DEL CONIUGATO *

Un flacone contenente 24ml di HEPES Proclin 150 e BSA. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

5) DILUENTE DEL TEST*

Due flaconi contenenti 50ml di tampone PBS, albumina da siero bovino e 0.09% sodioazide. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

6) SOLUZIONE CONCENTRATA DI LAVAGGIO (10x)*

Un flacone contenente 100ml di PBS e Tween 20, concentrato 10x.

Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

7) SUBSTRATO*

Un flacone contenente 20ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride /hydrogen peroxide (TMB/ H₂O₂). Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

8) SOLUZIONE BLOCCANTE*

Un flacone contenente 20ml di 1.0N acido solforico. Pronto all'uso.

Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

9) SIERO DI CONTROLLO POSITIVO

Un flacone contenente 1.5 ml di siero positivo per anticorpi anti-Cardiolipina, con 0.09% Sodiazide. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

10) SIERO DI CONTROLLO NEGATIVO

Unflacone contenente 1.5 ml di siero negativo per anticorpi anti-Cardiolipina, con 0.09% Sodiazide. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

*Questi reagenti possono essere usati anche con MESACUP Cardiolipin IgM

PRECAUZIONI PER L'USO

- (1) Questo prodotto è per solo uso diagnostico in vitro.
- (2) Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza riportata per ognuno.
- (3) Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle e gli indumenti. Se i reagenti vengono a contatto con la pelle, lavare immediatamente con acqua in abbondanza. TMB contiene sostanze irritanti e la Soluzione bloccante è composta da acido solforico 1N, velenoso e corrosivo.
- (4) Gli Standards ed i sieri di Controllo Positivo e Negativo derivano da siero umano, negativo per la presenza di antigeni HBs, anticorpi anti HCV ed HIV. Peraltro nessun test può garantire in maniera certa l'assenza di questi od altri agenti infettivi, dunque i reagenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente capaci di trasmettere malattie infettive note (AIDS, HCV etc) o sconosciute.
- (5) Standards, Controllo Negativo e Positivo, Diluente del Test contengono sodioazide (0.09%) come conservante, dunque essi devono essere maneggiati con cura (non ingerire o far venire a contatto con mucose o pelle). La sodioazide può reagire con rame o piombo per formare azidi metalliche esplosive. Quindi, diluire con abbondante acqua prima di smaltire.
- (6) Alcune componenti dei kits contengono materiali di origine animale, derivanti da animali non infetti. Queste componenti dovrebbero essere trattate come pericolose per la salute sia al momento dell'uso che a quello dello smaltimento.
- (7) Nel dosaggio devono essere usati Microwell strips e Standards dello stesso lotto. Non sostituire reagenti di un kit con quelli di un altro.
- (8) Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
- (9) Non esporre il kit alla diretta luce del sole durante l'esecuzione del test e la conservazione.
- (10) Evitare inquinamento batterico e cross contaminazione dei reagenti o dei campioni.
- (11) Tempi di incubazione al di sopra o al di sotto della temperatura ambiente (20-25°C), periodi di incubazione più brevi o lunghi e non precise diluizioni possono dare comportare errori nei risultati.
- (12) I pozzetti devono essere lavati con Soluzione di Lavaggio accuratamente per evitare false positività.
- (13) Pipettare accuratamente senza provocare schiuma ogni campione e reagente per evitare cross contaminazione da pozzetto a pozzetto.
- (14) Se non immediatamente richiesto, tutte le strips devono essere riposte nella busta ed accuratamente sigillate per evitare assorbimento di umidità.
- (15) La Soluzione concentrata di Lavaggio può divenire torbida a 2-8°C, ma questo non causa danni al

test.

(16) Materiali impiegati per il test devono essere trattati come segue:

Bagnare in soluzione 2% Glutaraldeide per più di 1 ora o in soluzione 0.5% Sodio Ipoclorito per più di 1 ora

o autoclavare a 121°C per più di 20 minuti.

Il valore di anticorpi anti Cardioplipina ottenuto da questo test è solo un aiuto per la diagnosi.

(17) Ogni medico deve interpretare i risultati alla luce della storia clinica del paziente, delle osservazioni

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda : 450nm, 620 nm/riferimento)
- Micropipetta multicanale (100µl – 300µl)
- Micropipetta a singolo canale (10µl & 100µl)
- Flaconi per reagenti
- Lavatore automatico o bottiglia per lavaggio
- Acqua deionizzata o distillata
- Cilindri graduati da 1 litro per la preparazione della Soluzione di Lavaggio
- Provette per la diluizione dei campioni dei pazienti (1000µl)
- Puntali usa e getta per la micropipette
- Carta
- Catinella e disinfettante
- Coperchio per piastra microtiter

PROCEDURA

■ PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Prima dell'uso portare tutti i materiali necessari al test a temperatura ambiente (20-25°C).
- Strips di micropozzetti: Rimuovere i pozzetti richiesti e piazzarli in apposito alloggio. Riporre prontamente nella busta le strips non richieste per la corretta conservazione refrigerata.
- Soluzione di Lavaggio: La Soluzione concentrata deve essere diluita prima dell'uso 1:10 aggiungendo 100ml di Soluzione concentrata a 900ml di acqua distillata. La Soluzione diluita è stabile per 2 settimane a 2-8°C.
- Coniugato: Il Coniugato deve essere diluito prima dell'uso, 1:101, con Diluente del Coniugato (ades. aggiungere 0.1ml di Coniugato a 9.9 ml di Diluente).
- Non diluire Standards, Controllo negativo, Controllo positivo, Diluente del test, Substrato e soluzione bloccante che sono pronti all'uso.

■ PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Diluire ogni siero di paziente 1: 101 aggiungendo 10µL di siero a 1mL di Diluente del Test.
 - *I campioni diluiti devono essere usati entro un giorno.
 - *I campioni diluiti possono essere impiegati anche per MESACUP Cardioplipin IgM.
- Usare sieri freschi di paziente. Se la conservazione è necessaria, i sieri devono essere congelati a -20°C fino ad un mese, a -70°C per maggiori periodi. Non ripetere congelamenti e scongelamenti.
 - *In caso di conservazione sotto -20°C per più di 6 mesi o di ripetuti congelamenti e scongelamenti, sono possibili risultati non specifici a causa di denaturazione di IgG.

■ PROCEDURA DEL TEST

1. INCUBAZIONE DEL CAMPIONE

Usando una micropipetta multicanale, trasferire 100 μ L degli Standards, di ogni diluito campione, di Controllo Positivo e Negativo nei giusti pozzetti della piastra microtiter.

- * L'incubazione parte pipettando dentro il pozzetto. La distribuzione deve essere completata nel minor tempo possibile.

Coprire i pozzetti con copripiastra ed incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C).

2. LAVAGGIO

Aspirare e scartare il contenuto dei pozzetti. Riempirli con Soluzione di Lavaggio e quindi aspirare e scartare il contenuto.

Lavare 4 volte. Asciugare con carta assorbente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio.

Quando si usa un lavatore automatico, lavare 4 volte.

- *Si raccomanda che ogni laboratorio standardizzi tempi di lavaggio e modalità.

- *La Soluzione di lavaggio dovrebbe essere usata a 20-25 °C.

3. INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

Versare il Coniugato in una bottiglia. Aggiungere 100 μ l di Coniugato ad ogni pozzetto con una micropipetta multicanale. Coprire i pozzetti con copripiastra ed incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C).

4. LAVAGGIO

Lavare la micropiastra come nel punto 2.

5. INCUBAZIONE DEL SUBSTRATO

Versare il Substrato in una bottiglia e pipettare 100 μ l del Substrato ad ogni pozzetto con una micropipetta multicanale.

- * Le bottiglie devono essere diversa da quella usata per la soluzione di Coniugato. Un nuovo recipiente dovrebbe essere impiegato poiché il Substrato è facilmente ossidato da ioni metallici.

- * Il Substrato una volta versato nella bottiglia non può essere rimesso nella bottiglia originale.

Coprire i pozzetti con copripiastra ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25 °C).

6. REAZIONE BLOCCANTE

Versare la Soluzione Bloccante in un flacone. Pipettare 100 μ l della soluzione in ogni pozzetto con una micropipetta multicanale.

■ LETTURA

Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre con doppia lunghezza d'onda, regolare la lunghezza d'onda del test a 450 nm ed il riferimento a 620 nm.

- * La lettura deve essere fatta quanto prima dopo l'arresto della reazione.

- * Assicurarsi che il fondo della micropiastra sia pulito ed asciutto e che bolle d'aria non siano presenti alla superficie del liquido nel pozzetto al momento della lettura.

■ CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare il valore medio di assorbanza di ogni standard e riportarlo su carta a scala logaritmica contro la concentrazione degli standard.

La concentrazione dei campioni può quindi essere letta dalla curva standard.

Alternativamente può essere usato un computer dotato di apposito programma.

*Il dosaggio è standardizzato con riferimento allo standard (unità: GPL) per ELISA determinato da E. Nigel Harris et al.

■ CONTROLLO QUALITA'

Ogni dosaggio deve soddisfare i seguenti criteri.

A_{450} di anti-Cardiolipina Standard-1: ≤ 0.09

A_{450} di anti-Cardiolipin Standard-6: 1.0 – 2.0

I Controlli devono dare i seguenti risultati:

	Controllo Positivo	Controllo Negativo
Anti-Cardiolipina val.(U/ml)	≥ 20	< 10

Se ognuno dei requisiti non viene soddisfatto, i risultati non sono validi ed il dosaggio deve essere ripetuto. Prima della ripetizione, verificare i seguenti passaggi.

- Temperatura di Incubazione
- Tempi di Incubazione
- Lavaggi

* Quando il valore quantitativo supera 120U/ml, esso deve essere interpretato come maggiore di 120U/ml, oppure il dosaggio deve essere ripetuto dopo diluizione del campione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E VALORI ATTESI

Questa che segue deve essere intesa solo come una guida all'interpretazione.

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca per l'interpretazione del dosaggio un suo proprio criterio basato su un campione di popolazione normalmente analizzato.

Anti-Cardiolipina valore	Interpretazione
< 10 U/ml	Negativo per anti-Cardiolipina
Greater than or equal to 10 U/ml	Positivo per anti-Cardiolipina

* Dosando con MESACUP Cardiolipin TEST campioni di siero ottenuti da 205 soggetti sani, il massimo valore di 95.0% tile è risultato inferiore a 10 U/ml.

■ LIMITAZIONI

Come per ogni altro test diagnostico, i risultati ottenuti con MESACUP Cardiolipin TEST

Servono solamente come ausilio nella diagnosi e non possono essere interpretati come di per sé diagnostici.

PRESTAZIONI DEL METODO

■ SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

Malattia	Campione	Percent. di Positività
APS	84/112	75.0%

SLE	94/213	44.1%
ITP	9/19	47.4%
Altre patologie	47/252	18.7%
Siero Normale	10/205	5.0%

APS: sindrome antifosfolipidi; SLE lupus sistemico eritematoso;

ITP: purpura idiopatica trombocitopenica

■ PRECISIONE

La ripetibilità è stata dimostrata analizzando 3 campioni in sestuplo. La riproducibilità è stata determinata analizzando 3 campioni in 5 giorni diversi (day to day) ed analizzando 3 campioni con 3 lotti (lot to lot). I valori di CV in percentuale per riproducibilità e ripetibilità sono stati inferiori al 15% per ogni campione.

■ ASSAY RANGE

Assay range di questo kit arriva a 120 U/ml.

■ SOSTANZE INTERFERENTI

Intrafat (più del 1.5%), Acido Ascorbico (più di 30 mg/ml), Emoglobina (maggiore di 600 mg/dl) e/o Bilirubina (oltre 8.0mg/dl) influiscono sul risultato del dosaggio.

Evitare l'uso di campioni fortemente emolizzati o altamente lipemici.

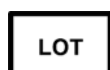
BIBLIOGRAFIA

1. Harris E.N., et al: Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. Clin EXP. Immunol 68: 215-222 (1987)
2. Hughes G.R.V., et al: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumatol. 13: 486-489 (1986)

Português

Ελληνικά

**The following symbols are used on the label.
 **Les symboles suivants ont été utilisés sur l'étiquette.
 **Die folgenden Symbole finden Sie auf dem Etikett.
 **En las etiquetas se usan los siguientes símbolos
 **I seguenti simboli sono usati sulle etichette.
 **Os símbolos seguintes são usados no rótulo.
 **Τα κάτωθι σύμβολα χρησιμοποιούνται στην ετικέτα



-

For in vitro diagnostic use
 Dispositif médical de diagnostic in vitro
 Für in-vitro Diagnostik
 Para uso diagnóstico in vitro
 Per uso diagnostico in vitro
 Para diagnóstico *in vitro*
 Για in vitro διαγνωστική χρήση
 Catalogue number
 Référence du catalogue
 Artikelnummer
 Número de catálogo
 Numero di catalogo
 Número de catálogo
 Αριθμός Καταλόγου
 Lot
 Code du lot
 Charge
 Lote
 Lotto
 Lote
 Παρτίδα
 96 tests
 Contenu suffisant pour 96 tests
 96 Bestimmungen
 96 test
 96 tests
 96 testes
 96 εξετάσεις
 See instructions for use
 Consulter les instructions d'utilisation
 Siehe Packungsbeilage
 Ver instrucciones de uso
 Vedi Istruzioni per l'uso
 Ver instruções de utilização
 Δείτε τις οδηγίες χρήσης
 Use by
 Utiliser jusque
 Haltbarkeit
 Temperatura de uso
 Uso da
 Utilizar até
 Να χρησιμοποιηθεί έως
 Store at 2 – 8°C
 Limites de température : 2 à 8°C
 Lagerung bei 2 – 8°C
 Conservar a 2 – 8°C
 Conservare a 2 – 8°C
 Armazenar a 2 – 8°C
 Φύλαξη στους 2 – 8°C



EC REP

<ELISA Components>

MICROWELL

CAL 1

CAL 2

CONTROL +

CONTROL -

STD 1

Manufactured by
Fabricant
Hersteller
Fabricado por
Prodotto da
Produzido por
Παρασκευάστηκε από
Authorized Representative
Mandataire dans la Communauté européenne
Bevollmächtigter
Representane Autorizado
Rappresentante Autorizzato
Representante Autorizado
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος

Microwell Strips
Micro plaque
Mikrotiterstreifen
Tiras de pocillos
Strips di micropozzetti
Microplacas
Ταινίες Βυθισμάτων
Calibrator 1
Calibrateur 1
Kalibrator 1
Calibrador 1
Calibratore 1
Calibrador 1
Αντιδραστήριο Βαθμονόμησης 1
Calibrator 2
Calibrateur 2
Kalibrator 2
Calibrador 2
Calibratore 2
Calibrador 2
Αντιδραστήριο Βαθμονόμησης 2
Positive Control
Contrôle positif
Positivkontrolle
Contro Positivo
Controllo Positivo
Controllo Positivo
Θετικό Πρότυπο Ελέγχου
Negative Control
Contrôle négatif
Negativkontrolle
Control Negativo
Controllo Negativo
Controllo Negativo
Αρνητικό Πρότυπο Ελέγχου
Standard Sera
Sérum Calibrateur 1
Standardserum
Suero Patrón
Sieri standard
Soro Padrão
Πρότυποι Οροί Καμπύλης

CONJ-HRP

Conjugate Reagent
Conjugué (prêt à l'emploi)
Konjugatreagenz
Reactivo Conjugado
Coniugato

CONJ-HRP 101x

Reagente conjugado
Αντιδραστήριο Συζεύγματος
Conjugate Reagent (101x)
Conjugué (101x)
Konjugatreagenz (101x)
Reactivo Conjugado (101x)
Coniugato (101x)

CONJ DIL

Reagente Conjugado (101x)
Αντιδραστήριο Συζεύγματος 101x
Conjugate Diluent
Diluant conjugué
Konjugatdiluent
Diluyente del conjugado
Diluyente del Coniugato
Diluyente do Conjugado

ASSAY DIL

Διαλύτης Αντιδραστηρίου Συζεύγματος
Assay Diluent
Diluant sérum
Probendiluent
Diluyente de Ensayo
Diluyente del Test
Diluyente

WASH CONC 10x

Διαλύτης Ανάλυσης
Wash Concentrate (10x)
Solution de lavage (10x)
Waschkonzentrat (10x)
Solución de Lavado Concentrada (10x)
Soluzione di Lavaggio concentrata (10x)
Solução de Lavagem Concentrada (10x)
Συμπυκνωμένο Πλυστικό 10 x

SUBS

Substrate
Substrat
Substrat
Substrato
Substrato
Substrato
Substrato

SUBS A

Υπόστρωμα
Substrate A
Substrat A
Substrat A
Substrato A
Substrato A
Substrato A
Υπόστρωμα A

SUBS B

Substrate B
Substrat B
Substrat B
Substrato B
Substrato B
Substrato B
Υπόστρωμα Β
Stop Solution
Solution d'arrêt
Stopplösung
Solución de Parada
Soluzione bloccante
Solução de Paragem
Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης

STOP SOLN

<IF Components>

SLIDE HEp-2

Hep-2 Cell Substrate Slide
Lames de Substrat Hep-2
HEp-2 Objektträger
Portas con sustrato de Células Hep-2
Cellule Hep-2 su vetrini come Substrato
Lâmina substrato Células HEp-2
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος HEp-2
Κυττάρων

SLIDE CL

Crithidia Luciliae Substrate Slide
Lames de Substrat Crithidia luciliae
Crithidia luciliae Objektträger
Portas con sustrato de Crithidia Luciliae
Crithidia Luciliae su vetrini come Substrato
Lâmina substrato Crithidia Luciliae
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος
Crithidia Luciliae

SLIDE KS

Rat stomach/ kidney Substrate Slide
Lames de Substrat Estomac/rein de rat
Rattenmagen/-niere Objektträger
Portas con sustrato de Estômago Rata/ Riñón
Stomaco/Rene di Ratto su vetrino come
Lâmina substrato Estomâgo/ Rim Rato
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος στομάχ
ου/ νεφρού αρουραίου

SLIDE KSL

Rat stomach/ kidney/ liver Substrate Slide
Lames de Substrat Estomac/rein/foie de rat
Rattenleber/-niere/-magen Objektträger
Portas con sustrato de Estômago Rata / Riñón/ H
ígado
Stomaco/Rene/Fegato di Ratto su vetrino come
Substrato

SLIDE Neutrophil-Et

Lâmina substrato Estomâgo/ Rim/Fígado Rato
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος στομάχ
ου/ νεφρού/ήπατος αρουραίου
Ethanol fixed neutrophil Substrate Slide
Lames de Substrat Neutrophile, fixées à l'éthanol
Objektträger mit Ethanol-fixierten neutrophilen
Granulozyten
Portas con sustrato de Neutrófilos fijados en
Neutrofili fissati in Etanolo su vetrino come
Lâmina substrato neutrófilos fixos etanol
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος ουδετε
ρόφιλων σταθεροποιημένων με αιθανόλη

SLIDE Neutrophil-Fo

Formalin fixed neutrophil Substrate Slide
Lames de Substrat Neutrophile, fixées à la
Objektträger mit Formalin-fixierten neutrophilen
Granulozyten
Portas con sustrato de Neutrófilos fijados en
Formalina
Neutrofili fissati in Formalina su vetrino come
Substrato

CONJ-FITC

Lâmina substrato neutrófilos fixos formol
Αντικειμενοφόρος Πλάκα Υποστρώματος ουδετε
ρόφιλων σταθεροποιημένων με φορμαλίνη

CAL

Conjugate
Conjugué
Konjugat
Conjugado
Coniugato
Conjugado
C-ANCA Θετικός Ορός Ελέγχου

DIL SOLN

Calibrator
Calibreur
Kalibrator
Calibrador
Calibratore
Calibrador

PBS

Αντιδραστήριο Βαθμονόμησης
Diluent Solution
Diluent Solution
Verdünnungsmittel
Solución de Dilución
Soluzione Diluente
Solução Diluente

CONTROL +

Διαλύτης Ανάλυσης
PBS Buffer
Tampon PBS
PBS-Puffer
Ταμπρόν PBS
Tampone PBS
Tampão PBS

CONTROL -

Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών
Positive Control
Sérum Contrôle Positif
Positivkontrolle
Control Positivo
Controllo Positivo
Controllo Positivo
Θετικό Πρότυπο Ελέγχου
Negative Control
Sérum Contrôle Négatif
Negativkontrolle
Control Negativo
Controllo Negativo
Controllo Negativo
Αρνητικό Πρότυπο Ελέγχου

CONTROL AMA

AMA Positive Control
Sérum Contrôle Positif AMA
AMA Positivkontrolle
Control AMA Positivo
AMA Controllo Positivo
Controlo Positivo AMA

CONTROL ASMA

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για AMA
ASMA Positive Control
Sérum Contrôle Positif ASMA
ASMA Positivkontrolle
Control ASMA Positivo
ASMA Controllo Positivo
Controlo Positivo ASMA

CONTROL APCA

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για ASMA
APCA Positive Control
Sérum Contrôle Positif APCA
APCA Positivkontrolle
Control APCA Positivo
APCA Controllo Positivo
Controlo Positivo APCA

CONTROL ANA

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για APCA
ANA Positive Control
Sérum Contrôle Positif ANA
ANA Positivkontrolle
ANA Positive Control
ANA Controllo Positivo
Controlo Positivo ANA

CONTROL C-ANCA

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για ANA
C-ANCA Positive Control
Sérum Contrôle Positif C-ANCA
C-ANCA Positivkontrolle
Control C-ANCA Positivo
C-ANCA Controllo Positivo
Controlo Positivo C-ANCA

CONTROL P-ANCA

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για C-ANCA
P-ANCA Positive Control
Sérum Contrôle Positif P-ANCA
P-ANCA Positivkontrolle
Control P-ANCA Positivo
P-ANCA Controllo Positivo
Controlo Positivo P-ANCA

MOUNT

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για P-ANCA
Mounting Medium
Milieu de Montage
Eindeckmittel
Medio de Montaje
Mezzo di Montaggio
Meio de Montagem
Υλικό Συγκόλλησης

COV SLIP

Cover Slip
Lamelles
Deckgläschen
Cubre Objetos
Vetrini Coprioggetto
Lamela
Καλυπτρίδα

BLOT PAPER

Blotting Paper
Papier absorbant
Löschpapier
Papier Secante
Carta Assorbente
Papier Absorbente
Στυπτικό Χαρτί

<DID Components>

GEL PLATE

Agarose Gel Plate
Gel d'agarose
Agarose Gelplatte
Placas de Gel de Agarosa
Piastrre di Gel di Agarosio
Placa de Gel de Agarose
Τρυβλίο γέλης αγαρόζης

ANTIGEN Sc

ENA Antigen
Antigène ENA
ENA-Antigen
ENA Antigeno
Antigene ENA
Antigénio ENA

ANTIGEN RNP/Sm

ENA Antigen
ENA Antigen for RNP/Sm
Antigène ENA RNP, Sm
ENA-Antigen für RNP/Sm
ENA Antigeno RNP/Sm
ENA Antigene RNP/Sm
Antigénio ENA para RNP/Sm
ENA Αντιγόνο για RNP/Sm

ANTIGEN SS-A

ENA Antigen for SS-A
Antigène ENA SS-A
ENA-Antigen für SS-A
ENA Antigeno SS-A
ENA Antigene SS-A
Antigénio ENA para SS-A

ANTIGEN SS-B

ENA Antigen for SS-B
Antigène ENA SS-B
ENA-Antigen für SS-B
ENA Antigeno SS-B
ENA Antigene SS-B
Antigénio ENA para SS-B

ANTIGEN Scl-70

ENA Antigen for Scl-70
Antigène ENA Scl-70
ENA-Antigen für Scl-70
ENA Antigeno Scl-70
ENA Antigene Scl-70
Antigénio ENA para Scl-70

ANTIGEN Jo-1

ENA Antigen for Jo-1
Antigène ENA Jo-1
ENA-Antigen für Jo-1
ENA Antigeno Jo-1
ENA Antigene Jo-1
Antigénio ENA para Jo-1
ENA Αντιγόνο για Jo-1

CONTROL RNP/Sm

RNP/Sm Positive Control
Contrôle positif RNP/Sm
RNP/Sm Positivkontrolle
Control Positivo RNP/Sm
Controllo Positivo RNP/Sm
Controllo Positivo RNP/Sm

CONTROL SS-A

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για RNP/Sm
SS-A Positive Control
Contrôle positif SS-A
SS-A Positivkontrolle
Control Positivo SS-A
Controllo Positivo SS-A
Controllo Positivo SS-A

CONTROL SS-B

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για SS-A
SS-B Positive Control
Contrôle positif SS-B
SS-B Positivkontrolle
Control Positivo SS-B
Controllo Positivo SS-B
Controllo Positivo SS-B

CONTROL Scl-70

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για SS-B
Scl-70 Positive Control
Contrôle positif Scl-70
Scl-70 Positivkontrolle
Control Positivo Scl-70
Controllo Positivo Scl-70
Controllo Positivo Scl-70

CONTROL Jo-1

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για Scl-70
Jo-1 Positive Control
Contrôle positif Jo-1
Jo-1 Positivkontrolle
Control Positivo Jo-1
Controllo Positivo Jo-1
Controllo Positivo Jo-1

SAMPLE DIL

Θετικό Πρότυπο Ελέγχου για Jo-1
Sample Diluent
Diluant échantillon
Probendiluent
Diluyente de Muestra
Diluyente del Campione
Diluyente da Amostra
Διαλυτής Ανάλυσης

Manufactured by:
Fabriqué par:
Hersteller:
Fabricado por:
Prodotto da:
Produzido por:
Παρασκευάστηκε από:

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

5-10 Marunouchi 3-chome, Naka-ku, Nagoya 460-0002, JAPAN

Tel: +81 52-971-2081

Fax: +81 52-971-2337

Authorized Representative in the EU:
Mandataire dans la Communauté européenne:
Bevollmächtigter in der EU:
Representante autorizado en EU:
Rappresentante Autorizzato per l'Unione Europea:
Representante Autorizado na UE:
Εξουσιοδοτημένος Αντιπρόσωπος στην ΕΕ:

QARAD b.v.b.a.

Volmolenheide 13, 2400 Mol, Belgium

Rev. July 23, 2007
23/7/2007



Printing date: 3/4/2010