



DCM112-7

Ed. 01/2024

Anti Cardiolipin IgM

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli autoanticorpi IgM contro la cardiolipina nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere l'etichetta esterna

2°C  8°C $\Sigma = 96$ test

REF DKO112

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Anti Cardiolipin IgM è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di anticorpi di classe IgM diretti contro la cardiolipina nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi della sindrome da antifosfolipidi (APS).

2. RILEVANZA CLINICA

La cardiolipina è un fosfolipide caricato negativamente che si trova in genere nella membrana mitocondriale interna¹. Gli autoanticorpi diretti contro la cardiolipina fanno parte di un gruppo noto come anticorpi antifosfolipidi che comprende gli autoanticorpi anti- β 2 glicoproteina 1. La misurazione degli autoanticorpi anti-cardiolipina è considerata uno dei marcatori più importanti per sostenere la diagnosi della sindrome da antifosfolipidi (APS)^{2,3}.

L'APS è un disturbo autoimmune sistemico caratterizzato da una combinazione di trombosi arteriose e/o venose, complicanze della gravidanza, quali perdita fetale ricorrente, insieme a livelli elevati di anticorpi antifosfolipidi⁴. L'APS è stata descritta per la prima volta in pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES), anche se successivamente è stato stabilito che il LES può essere indipendente da una malattia sottostante⁵.

L'APS può presentarsi da sola (APS primaria o in associazione ad altre condizioni, come il LES) o come APS secondaria⁶ (6). Tuttavia, è stato dimostrato che gli anticorpi anti-cardiolipina (aCL) possono essere rilevati in pazienti con LES che non sviluppano APS secondaria⁷⁻⁹. Inoltre, gli eventi tromboembolici sono la manifestazione clinica più comune dell'APS.

Gli anticorpi anti-cardiolipina possono riconoscere sia la cardiolipina sia porzioni del complesso proteina-fosfolipide β 2 glicoproteina 1-cardiolipina^{10,11}.

Alcuni studi hanno indicato un'associazione di anticorpi IgG e IgM anti-cardiolipina^{2,7,11-16}, con eventi trombotici, mentre

altri suggeriscono che questi siano correlati all'isotipo IgG, ma non all'IgM^{6,10,17}.

È stato dimostrato che gli anticorpi IgM aCL sono presenti in infezioni quali epatite C cronica, lebbra e sifilide, ma non sono direttamente coinvolti in eventi trombotici¹⁷.

È probabile che la presenza di anticorpi antifosfolipidi, tra cui IgG e IgM aCL, costituisca il singolo fattore di rischio più riconoscibile nei casi di perdita della gravidanza ricorrente e complicanze ostetriche mediate dalla placenta tardiva^{4-6,11,14-15,18,19}. Laddove le pazienti possono presentare solo esiti avversi della gravidanza con eventi vascolari isolati o con manifestazioni sia ostetriche sia trombotiche⁶. È stato suggerito che gli anticorpi anti- β 2-glicoproteina 1 – cardiolipina sono in grado di riconoscere l'antigene su tessuti placentari, inibendo la crescita e la differenziazione dei trofoblasti che possono infine causare una placentazione difettosa²⁰.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Anti Cardiolipin IgM è un dosaggio immunometrico enzimatico (ELISA) a sandwich in due fasi in cui i campioni dei pazienti, i calibratori o i controlli sono incubati su piastre per microtitolazione rivestite con il complesso antigenico cardiolipina- β 2 glicoproteina. Durante l'incubazione, gli anticorpi presenti nel campione di test si legano al complesso antigenico immobilizzato. Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida.

Una successiva incubazione si verifica con anti-IgM umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP), che si lega agli anticorpi immobilizzati. Viene eseguita un'ulteriore fase di lavaggio per rimuovere il coniugato in eccesso. Quindi, una soluzione di substrato cromogenico contenente TMB viene erogata nei pozzetti che reagisce con l'HRP coniugato e si sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgM anti-cardiolipina nel campione.

La concentrazione di anticorpo anti-cardiolipina nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (5 fiale, 1,2 mL ciascuno)

Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%, BSA 3%

CAL0	REF DCE002/11206-0
CAL1	REF DCE002/11207-0
CAL2	REF DCE002/11208-0
CAL3	REF DCE002/11209-0
CAL4	REF DCE002/11210-0

2. Controlli (2 fiale, 1,2 mL ciascuna, pronte all'uso)

Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%, BSA 3%

Controllo negativo	REF DCE045/11201-0
Controllo positivo	REF DCE045/11202-0

3. Diluente per campione (1 fiala, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%

REF DCE053-0

4. Coniugato (1 fiala, 15 mL)

Coniugato anti h-IgM con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, ProClin >0,0015%

REF DCE002/11202-0

5. Micropiastra rivestita (1 micropiastra frangibile)

Micropiastra rivestita con complesso antigenico cardiopalina- β 2-glicoproteina

REF DCE002/11203-0

6. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare qualsiasi contatto con la pelle), ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 M (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2 M, pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Letto di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (coniugato soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori e controlli) contengono piccole quantità di azoturo di sodio (NaN_3) <0,1% che può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi. Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
 - La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
 - Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- #### 6. PRECAUZIONI
- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
 - Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
 - Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
 - Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.

- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- **AVVERTENZA: il reagente coniugato è progettato per garantire la massima sensibilità per la dose e può essere contaminato da agenti esterni se non utilizzato correttamente;** pertanto, si raccomanda di utilizzare materiali di consumo monouso (puntali, flaconi, vassoi, ecc.). Per le dosi divise, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria e non reintrodurre alcun prodotto di scarto nel flacone originale. Inoltre, **per le dosi erogate con l'ausilio di dispositivi automatici e semiautomatici,** prima di utilizzare il coniugato, è consigliabile pulire il sistema per la gestione dei fluidi, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci per evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è altamente raccomandata quando il kit viene elaborato con analizzatori non dotati di puntali monouso.**
A tale scopo, DiaMetra fornisce un reagente di decontaminazione separato per la pulizia degli aghi.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	3 cicli

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori e i controlli sono pronti per l'uso.

I calibratori presentano all'incirca le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

9.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciogliendo il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.3. Preparazione dei campioni

Tutti i campioni di siero e plasma devono essere diluiti 1:100 con diluente per campione.

ad es. 10 µL di campione devono essere diluiti con 990 µL di diluente per campione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.4. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del

test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagenti	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	

Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22-28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto; lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Coniugato	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22-28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto; lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Lavaggio: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).

Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
----------------------	--------	--------	--------

Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra. Questo test è valido solo se la densità ottica a 450 nm per i controlli e per i calibratori (C₀-C₄) rientra nel rispettivo intervallo indicato sul Certificato di controllo qualità allegato a ciascun kit del test.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi²¹.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) con coordinate log-lineari **che includa il calibratore 0**. È possibile utilizzare un adattamento uniforme della curva spline che includa il calibratore 0. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del test (AMR) è 2,08-80 AU/mL. Qualsiasi valore inferiore a 2,09 AU/mL deve essere indicato come "< 2,08 AU/mL". Qualsiasi valore superiore a 80 AU/mL deve essere indicato come "> 80 AU/mL".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

I calibratori di questo kit sono tracciabili al Centres for Disease Control (CDC) Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 [IS2718].

14. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Concentrazione	Interpretazione
< 8 AU/mL	Il campione deve essere considerato negativo
8–10 AU/mL	Il campione deve essere classificato equivoco e la ripetizione dei test/campionamenti deve essere eseguita secondo le pratiche interne
> 10 AU/mL	Il campione deve essere considerato positivo

La determinazione di un intervallo di valori attesi per una popolazione "normale" di un determinato metodo dipende da diversi fattori, come la specificità e la sensibilità del metodo utilizzato e il tipo di popolazione in esame. Pertanto, ogni laboratorio deve considerare l'intervallo fornito dal produttore come un'indicazione generale e produrre il proprio intervallo di valori attesi sulla base della popolazione autoctona.

I risultati positivi devono essere verificati in relazione all'intero stato clinico del paziente e la decisione per la terapia deve essere presa in base alle condizioni di ciascun paziente. È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli normali e patologici dei valori di IgM anti-cardiolipina.

15. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,76 AU/mL
Limite di rilevamento (LoD)	1,45 AU/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	2,08 AU/mL

15.2. Esattezza

L'esattezza del test Anti Cardiolipin IgM è stata dimostrata attraverso l'esecuzione di un test di recupero utilizzando il CDC Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 [IS2718].

15.3. Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate con CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" utilizzando 73 campioni negativi e 62 positivi eseguiti su due lotti di reagenti.

		DKO112		Totale
		Positivo	Negativo	
Stato reale	Positivo	50	12	62
	Negativo	0	73	73
Totale		50	85	135

Sensibilità diagnostica: 80%

Specificità diagnostica: 100%

15.4. Precisione

La precisione del test Anti Cardiolipin IgM è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (AU/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	CV
1	75	7,74	0,40	5,2%
2	75	12,46	0,51	4,1%
3	75	21,06	0,99	4,7%
4	75	32,07	1,46	4,6%
5	75	55,15	1,19	2,2%
6	75	75,45	2,33	3,1%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (AU/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	7,65	0,46	6,0%
2	150	12,33	0,74	6,0%
3	150	21,03	1,60	7,6%
4	150	31,89	1,98	6,2%
5	150	54,28	2,70	5,0%
6	150	75,46	2,63	3,5%

15.5. Linearità

La linearità è stata valutata in base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di anti-cardiolipina mediante il test Anti Cardiolipin IgM, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo compreso tra 0,82 e 86,88 AU/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

15.6. Specificità analitica

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test Anti Cardiolipin IgM quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	10 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

15.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Anti Cardiolipin IgM per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 20 campioni (16 nativi, 4 additivati) per coprire l'intervallo del test. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,02 [da 0,94 a 1,09]	0,19 [da -1,34 a 1,72]	0,99
Litio eparina	0,93 [da 0,82 a 1,04]	0,73 [da -1,49 a 2,95]	0,97
Sodio eparina	0,93 [da 0,84 a 1,01]	0,64 [da -1,00 a 2,28]	0,98
EDTA	0,96 [da 0,86 a 1,05]	0,65 [da -1,19 a 2,49]	0,98

16. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*²².

I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

- La presenza di immunocomplessi o altri aggregati di immunoglobuline nel campione del paziente può causare un aumento del livello di legame non specifico e produrre falsi positivi in questo test.

17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

18. BIBLIOGRAFIA

1. Dusse LM, Silva FD, Freitas LG, Rios DR, *et al.* Antiphospholipid syndrome: a clinical and laboratorial challenge. Rev Assoc Med Bras (1992). 2014 Mar-Apr;60(2):181-6.
2. Roggenbuck D, Somma V, Schierack P, Borghi MO, Meroni PL. Autoantibody profiling in APS. Lupus. 2014 Oct;23(12):1262-4.
3. Banzato A, Pengo V. Clinical relevance of β_2 -glycoprotein-I plasma levels in antiphospholipid syndrome (APS). Curr Rheumatol Rep. 2014 Jun;16(6):424.
4. Amiral J, Peyrafitte M, Dunois C, Vissac AM, Seghatchian J. Anti-phospholipid syndrome: Current opinion on mechanisms involved, laboratory characterization and diagnostic aspects. Transfus Apher Sci. 2017 Aug;56(4):612-625.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006 Feb;4(2):295-306.
6. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? J Autoimmun. 2000 Sep;15(2):163-72.
7. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, *et al.*; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Arthritis Rheum. 2002 Apr;46(4):1019-27.
8. Linnemann B. Antiphospholipid syndrome - an update. Vasa. 2018 Oct;47(6):451-464.
9. Calvo-Alén J, Toloza SM, Fernández M, Bastian HM, *et al.*; LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant, and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. Arthritis Rheum. 2005 Jul;52(7):2060-8.
10. Janardhan V, Wolf PA, Kase CS, Massaro JM, *et al.* Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham cohort and offspring study. Stroke. 2004 Mar;35(3):736-41.

11. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus*. 2002;11(5):269-75.
12. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, *et al*. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1226-32.
13. Singh AK. Immunopathogenesis of the antiphospholipid antibody syndrome: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 May;10(3):355-8.
14. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Feb;13(1):70-6.
15. Suh-Lailam BB, Cromar A, Davis KW, Tebo AE. APhL antibody ELISA as an alternative to anticardiolipin test for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(3):210-5.
16. Ofer-Shiber S, Molad Y. Frequency of vascular and pregnancy morbidity in patients with low vs. moderate-to-high titers of antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015 Apr;26(3):261-6.
17. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun;7(6):330-9.
18. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, *et al*. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1767-73.
19. Sanmarco M, Roll P, Gayet S, Oksman F, *et al*. J. Combined search for anti-beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in antiphospholipid syndrome: contribution to diagnosis. *J Lab Clin Med*. 2004 Sep;144(3):141-7.
20. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, *et al*. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):504-12.
21. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
22. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

20. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM112-7

19. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.



DCM112-7

Ed. 01/2024

Anti Cardiolipin IgM

for routine analysis

Quantitative determination of IgM autoantibodies against Cardiolipin in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ tests

REF DKO112

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Anti Cardiolipin IgM is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of IgM class antibodies directed against cardiolipin in human serum or plasma from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS).

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Cardiolipin is a negatively charged phospholipid which is typically located in the inner mitochondrial membrane¹. Autoantibodies directed against cardiolipin are part of a group known as antiphospholipid antibodies which includes anti- β 2 glycoprotein 1 autoantibodies. Measurement of anti-cardiolipin autoantibodies is considered to be one of the most important markers to support diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS)^{2,3}.

APS is a systemic autoimmune disorder characterised by a combination of arterial and/or venous thromboses, pregnancy complications, such as recurrent foetal loss, together with elevated levels of antiphospholipid antibodies⁴. APS was first described in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), though it has subsequently been established that SLE may be independent of an underlying disease⁵.

APS can occur alone – Primary APS, or in association with other conditions, such as SLE – Secondary APS⁶ (6). However, it has been demonstrated that anti-cardiolipin antibodies (aCLs) can be detected in patients with SLE that do not develop Secondary APS⁷⁻⁹. However, thromboembolic events are the most common clinical manifestation of APS

Anti-cardiolipin antibodies can recognise both cardiolipin and portions of the phospholipid-protein complex β 2 glycoprotein 1-cardiolipin^{10,11}.

Studies have indicated an association of anti-cardiolipin IgG and IgM antibodies^{2,7,11-16}, with thrombotic events whereas others suggest these to be linked with IgG isotype, but not IgM^{6,10,17}.

aCL IgM antibodies have been shown to occur in infections such as chronic hepatitis C, leprosy, syphilis, but they are not directly involved in thrombotic events¹⁷.

It is likely that the presence of antiphospholipid antibodies, including aCL IgG and IgM constitutes the single most recognisable risk factor in cases of recurrent pregnancy loss and late placenta-mediated obstetric complications^{4-6,11,14-15,18,19}. Where patients can present with only adverse pregnancy outcomes with isolated vascular events or with both obstetric and thrombotic manifestations⁶. It has been suggested that anti- β 2-glycoprotein I – cardiolipin antibodies are able to recognise the antigen on placental tissues, inhibiting the growth and differentiation of trophoblasts which may eventually cause defective placentation²⁰.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Anti Cardiolipin IgM assay is a two-step sandwich enzyme immunometric assay (ELISA) where patient samples, calibrators or controls are incubated on microtitre plates coated with the antigenic cardiolipin- β 2 glycoprotein complex. During the incubation, antibodies present in the test sample bind to the immobilised antigen complex. After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing.

A subsequent incubation occurs with anti-human IgM conjugated with horseradish peroxidase (HRP), which binds to the immobilised antibodies. A further wash step is performed to remove excess conjugate. Then, a chromogenic substrate solution containing TMB is dispensed into the wells which reacts with the conjugated HRP and a blue colour develops that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The colour intensity is directly proportional to the Anti Cardiolipin IgM concentration in the sample.

Anti-cardiolipin antibody concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1.2 mL each)

Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 <0.1%, BSA 3%

CAL0 REF DCE002/11206-0

CAL1 REF DCE002/11207-0

CAL2 REF DCE002/11208-0

CAL3 REF DCE002/11209-0

CAL4 REF DCE002/11210-0

2. Controls (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)

Phosphate buffer 0.1M, NaN_3 <0.1%, BSA 3%

Negative Control REF DCE045/11201-0

Positive Control REF DCE045/11202-0

3. Sample Diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 0.1 M, NaN_3 <0.1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Anti h-IgM conjugate with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0.1%, ProClin $\geq$ 0.0015%

REF DCE002/11202-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with antigenic Cardiolipin- β 2-Glycoprotein complex

REF DCE002/11203-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact), ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4, ProClin >0.0015%

REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Contains: ProClin 300

Warning

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators, controls and sample diluent) contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) <0.1% which may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through large with amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/ H_2O_2 to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinisation and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analysers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, DiaMetra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin, or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	96 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

The calibrators and controls are ready to use.

The calibrators and approximately the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

9.2. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “10X Conc. Wash Solution” with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.3. Preparation of Samples

All serum and plasma samples must be diluted 1:100 with sample diluent.

e.g., 10 µL of sample should be diluted with 990 µL of sample diluent.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2-8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each control, two for each sample, one for blank.

Reagents	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	

Incubate for 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

Conjugate	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubate for 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL diluted wash solution.

Washing: follow the same indications of the previous point.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake the microplate gently.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate. This test is only valid if the optical density at 450 nm for the controls as well as for the calibrators (C₀-C₄) fall within with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed in each test kit.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give

control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories²¹.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit with lin-log coordinates, **including Calibrator 0 is required**. A smoothed spline fit including Calibrator 0 can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 2.08 – 80 AU/mL. Any value that reads below 2.09 AU/mL should be reported as “< 2.08 AU/mL”. Any value that reads above 80 AU/mL should be reported as “> 80 AU/mL”.

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The calibrators of this kit are traceable to the Centres for Disease Control (CDC) Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 [IS2718].

14. INTERPRETATION OF RESULTS

Concentration	Interpretation
< 8 AU/mL	The sample should be considered negative
8 – 10 AU/mL	The sample should be graded equivocal and repeat testing / sampling should be performed according to internal practices
>10 AU/mL	The sample should be considered positive

Determination of a range of expected values for a “normal” population of a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore, each laboratory should consider the range given by the

Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient, with the decision for therapy being taken on an individual basis. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of Anti-Cardiolipin IgM values.

15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

15.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.76 AU/mL
Limit of Detection (LoD)	1.45 AU/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	2.08 AU/mL

15.2. Trueness

Trueness of the Anti Cardiolipin IgM assay has been demonstrated through performance of a recovery test using the CDC Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 [IS2718].

15.3. Diagnostic Sensitivity and Specificity

The sensitivity and specificity were determined with guidance from CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves" using 73 negative and 62 positive samples run on two reagent lots.

		DKO112		Total
		Positive	Negative	
True state	Positive	50	12	62
	Negative	0	73	73
Total		50	85	135

Diagnostic sensitivity: 80%

Diagnostic specificity: 100%

15.4. Precision

Precision of the Anti Cardiolipin IgM was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (AU/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV
1	75	7.74	0.40	5.2%
2	75	12.46	0.51	4.1%
3	75	21.06	0.99	4.7%
4	75	32.07	1.46	4.6%
5	75	55.15	1.19	2.2%
6	75	75.45	2.33	3.1%

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (AU/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	7.65	0.46	6.0%
2	150	12.33	0.74	6.0%
3	150	21.03	1.60	7.6%
4	150	31.89	1.98	6.2%
5	150	54.28	2.70	5.0%
6	150	75.46	2.63	3.5%

15.5. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For anti-cardiolipin concentration by Anti Cardiolipin IgM, the measurement procedure shows linearity for the interval from 0.82 to 86.88 AU/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of ±15 %.

15.6. Analytical Specificity

The following substances do not interfere with a bias of > ±15% in the Anti Cardiolipin IgM assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	10 g/dL
Triglyceride	500 mg/dL

15.7. Serum-plasma study

The Anti Cardiolipin IgM matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 20 samples (16 native, 4 spiked) to cover the assay range were evaluated. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.02 [0.94 to 1.09]	0.19 [-1.34 to 1.72]	0.99
Lithium Heparin	0.93 [0.82 to 1.04]	0.73 [-1.49 to 2.95]	0.97
Sodium Heparin	0.93 [0.84 to 1.01]	0.64 [-1.00 to 2.28]	0.98
EDTA	0.96 [0.86 to 1.05]	0.65 [-1.19 to 2.49]	0.98

16. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays²². Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.
- The presence of immune complexes or other immunoglobulin aggregates in the patient sample may cause an increased level of non-specific binding and produce false positives in this assay.

17. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

18. BIBLIOGRAPHY

1. Dusse LM, Silva FD, Freitas LG, Rios DR, *et al.* Antiphospholipid syndrome: a clinical and laboratorial challenge. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2014 Mar-Apr;60(2):181-6.
2. Roggenbuck D, Somma V, Schierack P, Borghi MO, Meroni PL. Autoantibody profiling in APS. *Lupus*. 2014 Oct;23(12):1262-4.
3. Banzato A, Pengo V. Clinical relevance of β_2 -glycoprotein-I plasma levels in antiphospholipid syndrome (APS). *Curr Rheumatol Rep*. 2014 Jun;16(6):424.
4. Amiral J, Peyrafitte M, Dunois C, Vissac AM, Seghatchian J. Anti-phospholipid syndrome: Current opinion on mechanisms involved, laboratory characterization and diagnostic aspects. *Transfus Apher Sci*. 2017 Aug;56(4):612-625.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006 Feb;4(2):295-306.
6. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun*. 2000 Sep;15(2):163-72.
7. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, *et al.* Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):1019-27.
8. Linnemann B. Antiphospholipid syndrome - an update. *Vasa*. 2018 Oct;47(6):451-464.
9. Calvo-Alén J, Toloza SM, Fernández M, Bastian HM, *et al.*; LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant, and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. *Arthritis Rheum*. 2005 Jul;52(7):2060-8.
10. Janardhan V, Wolf PA, Kase CS, Massaro JM, *et al.* Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham cohort and offspring study. *Stroke*. 2004 Mar;35(3):736-41.
11. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus*. 2002;11(5):269-75.
12. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, *et al.* The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1226-32.
13. Singh AK. Immunopathogenesis of the antiphospholipid antibody syndrome: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 May;10(3):355-8.
14. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Feb;13(1):70-6.
15. Suh-Lailam BB, Cromar A, Davis KW, Tebo AE. APHL antibody ELISA as an alternative to anticardiolipin test for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(3):210-5.
16. Ofer-Shiber S, Molad Y. Frequency of vascular and pregnancy morbidity in patients with low vs. moderate-to-high titers of antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015 Apr;26(3):261-6.
17. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun;7(6):330-9.

18. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1767-73.
19. Sanmarco M, Roll P, Gayet S, Oksman F, *et al.* J. Combined search for anti-beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in antiphospholipid syndrome: contribution to diagnosis. *J Lab Clin Med.* 2004 Sep;144(3):141-7.
20. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, *et al.* Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 2012 Feb;64(2):504-12.
21. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
22. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

19. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

20. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM112-7



DCM112-7
Ed. 01/2024

Anti Cardiolipin IgM

para el análisis de rutina

Determinación cuantitativa de autoanticuerpos IgM contra la cardiolipina en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO112

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Anti Cardiolipin IgM es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de anticuerpos de clase IgM dirigidos contra la cardiolipina en suero o plasma humano de una población adulta. Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF) junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La cardiolipina es un fosfolípido con carga negativa que suele estar localizado en la membrana mitocondrial interna¹. Los autoanticuerpos dirigidos contra la cardiolipina forman parte de un grupo conocido como anticuerpos antifosfolípidos que incluye los autoanticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína 1. La medición de los autoanticuerpos anticardiolipina se considera uno de los marcadores más importantes para apoyar el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF)^{2,3}.

El SAF es un trastorno autoinmunitario sistémico caracterizado por una combinación de trombos arteriales y/o venosos, complicaciones del embarazo, como la pérdida gestacional recurrente, y niveles elevados de anticuerpos antifosfolípidos⁴. El SAF se describió por primera vez en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), aunque posteriormente se ha establecido que el LES puede existir de forma independiente a una enfermedad subyacente⁵.

El SAF puede darse por sí mismo (SAF primario) o puede estar asociado a otras condiciones médicas como el LES (SAF secundario)⁶ (6). Sin embargo, se ha demostrado que pueden detectarse anticuerpos anticardiolipina (aCL) en pacientes con LES que no desarrollan SAF secundario⁷⁻⁹. No obstante, los eventos tromboembólicos son la manifestación clínica más común del SAF.

Los anticuerpos anticardiolipina pueden reconocer tanto la cardiolipina como partes del complejo de fosfolípidos y proteínas $\beta 2$ glicoproteína 1-cardiolipina^{10,11}.

Existen estudios que indican una asociación de los anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM^{2,7,11-16} con los

eventos trombóticos, mientras que otros sugieren que estos están relacionados con el isotipo IgG, pero no con el IgM^{6,10,17}.

Se ha demostrado que los anticuerpos IgM aCL aparecen en infecciones como la hepatitis C crónica, la lepra o la sífilis, pero no están directamente implicados en eventos trombóticos¹⁷.

Es probable que la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, incluidos los aCL IgG e IgM, constituya el factor de riesgo más reconocible en los casos de pérdida de recurrente del embarazo y de complicaciones obstétricas mediadas por la placenta tardía^{4-6,11,14-15,18,19}. Las pacientes pueden presentar únicamente resultados adversos del embarazo con eventos vasculares aislados o con manifestaciones tanto obstétricas como trombóticas⁶. Se ha sugerido que los anticuerpos anti- $\beta 2$ -glicoproteína 1-cardiolipina son capaces de reconocer el antígeno en los tejidos de la placenta, inhibiendo el crecimiento y la diferenciación de los trofoblastos, lo que puede causar finalmente una placentación defectuosa²⁰.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Anti Cardiolipin IgM es un ensayo enzimático inmunométrico (ELISA) de dos pasos tipo sándwich en el que las muestras de los pacientes, los calibradores o los controles se incuban en placas de microtitulación recubiertas con el complejo antigénico cardiolipina- $\beta 2$ glicoproteína. Durante la incubación, los anticuerpos presentes en la muestra de ensayo se unen al complejo de antígenos inmovilizados. Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida.

A continuación, se realiza una incubación con IgM antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), que se une a los anticuerpos inmovilizados. Se realiza otro paso de lavado para eliminar el exceso de conjugado. A continuación, se dispensa en los pocillos una solución de sustrato cromogénico que contiene TMB, que reacciona con el HRP conjugado y se desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de anticardiolipina IgM de la muestra.

La concentración de anticuerpos anticardiolipina en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 viales de 1,2 mL cada uno)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%, BSA 3%

CAL0 **REF** DCE002/11206-0

CAL1 **REF** DCE002/11207-0

CAL2 **REF** DCE002/11208-0

CAL3 **REF** DCE002/11209-0

CAL4 **REF** DCE002/11210-0

2. Controles (2 viales de 1,2 mL cada uno, listos para usar)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%, BSA 3%

Control negativo **REF** DCE045/11201-0

Control positivo **REF** DCE045/11202-0

3. Diluyente de muestras (1 vial, 100 mL)

Tampón fosfato 0,1 M, NaN_3 <0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugado (1 vial, 15 mL)

IgM antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), BSA 0,1%, ProClin >0,0015%

REF DCE002/11202-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta con el complejo antigénico cardiolipina- β 2 glicoproteína

REF DCE002/11203-0

6. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel), ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores, controles y diluyente de muestras) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN_3) <0,1% que puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.

- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente **validado para su uso previsto**.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **ADVERTENCIA: el reactivo conjugado está diseñado para garantizar la máxima sensibilidad de la dosis y puede contaminarse con agentes externos si no se utiliza correctamente;** por lo tanto, se recomienda utilizar consumibles desechables (puntas, frascos, bandejas, etc.). Para dosis divididas, tome la cantidad exacta de conjugado necesaria y no vuelva a introducir ningún producto de desecho en el frasco original. Además, **para las dosis dispensadas mediante dispositivos automáticos y semiautomáticos,** antes de utilizar el conjugado, es aconsejable limpiar el sistema de manipulación de fluidos, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación sean eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento es muy recomendable cuando el kit se procesa con analizadores que no están equipados con puntas desechables.** Para ello, DiaMetra proporciona un reactivo de descontaminación independiente para la limpieza de las agujas.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Los calibradores y controles están listos para usarse.

Los calibradores tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
AU/mL	0	5	10	20	80

9.2. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.3. Preparación de las muestras

Todas las muestras de suero y plasma deben diluirse a una concentración de 1:100 con diluyente de muestras.

Por ejemplo, 10 µL de muestra deben diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.4. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	

Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C).

Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.

Conjugado	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C).

Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Lavado: siga las mismas indicaciones del punto anterior.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y

los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa. Esta prueba solo es válida si la densidad óptica a 450 nm de los controles y de los calibradores (C₀-C₄) está dentro del rango respectivo indicado en el Certificado de control de calidad que se incluye con cada kit de prueba.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control²¹.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL) con coordenadas lineales y logarítmicas, **incluido el calibrador 0**. También se puede usar un ajuste de splines suavizado que incluya el calibrador 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 2,08-80 AU/mL.

Cualquier valor que sea inferior a 2,09 AU/mL debe informarse como «< 2,08 AU/mL». Cualquier valor que sea superior a 80 AU/mL debe informarse como «> 80 AU/mL».

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

Los calibradores de este kit son trazables según el estándar EY2C9 del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) sobre el anticuerpo humano monoclonal anticardiolipina IgM [IS2718].

14. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Concentración	Interpretación
< 8 AU/mL	La muestra debe considerarse negativa.
8-10 AU/mL	La muestra debe ser calificada como equívoca y la repetición de la prueba/muestreo debe realizarse de acuerdo con las prácticas internas.
> 10 AU/mL	La muestra debe considerarse positiva.

La determinación de un rango de valores esperados para una población «normal» de un método dado depende de muchos factores, como la especificidad y la sensibilidad del método utilizado y el tipo de población en investigación. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el rango dado por el fabricante como una indicación general y establecer su propio rango de valores esperados en función de la población autóctona.

Los resultados positivos deben verificarse en relación con el estado clínico general del paciente, y la decisión de la terapia se toma de forma individual. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales y patológicos de valores de anticardiolipina IgM.

15. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

15.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,76 AU/mL
Límite de detección (LoD)	1,45 AU/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	2,08 AU/mL

15.2. Veracidad

La veracidad del ensayo Anti Cardiolipin IgM se ha demostrado mediante la realización de una prueba de recuperación utilizando el estándar del CDC EY2C9 sobre el anticuerpo humano monoclonal anticardiolipina IgM [IS2718].

15.3. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

La sensibilidad y la especificidad se determinaron con orientación del documento CLSI EP-24 "Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves", usando 73 muestras negativas y 62 positivas realizadas en dos lotes de reactivos.

		DKO112		Total
		Positivo	Negativo	
Estado real	Positivo	50	12	62
	Negativo	0	73	73
Total		50	85	135

Sensibilidad del diagnóstico: 80 %

Especificidad del diagnóstico: 100 %

15.4. Precisión

La precisión de Anti Cardiolipin IgM se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Medio conc. (AU/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV
1	75	7,74	0,40	5,2 %
2	75	12,46	0,51	4,1 %
3	75	21,06	0,99	4,7 %
4	75	32,07	1,46	4,6 %
5	75	55,15	1,19	2,2 %
6	75	75,45	2,33	3,1 %

Reproducibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Medio conc. (AU/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	7,65	0,46	6,0 %
2	150	12,33	0,74	6,0 %
3	150	21,03	1,60	7,6 %
4	150	31,89	1,98	6,2 %
5	150	54,28	2,70	5,0 %
6	150	75,46	2,63	3,5 %

15.5. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de anticardiolipina mediante Anti Cardiolipin IgM, el procedimiento de medición muestra linealidad para el intervalo de 0,82 a 86,88 AU/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

15.6. Especificidad analítica

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15$ % en el ensayo Anti Cardiolipin IgM cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	10 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

15.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz de Anti Cardiolipin IgM se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices de CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 20 muestras (16 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó un análisis de regresión lineal sobre los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,02 [0,94 a 1,09]	0,19 [-1,34 a 1,72]	0,99
Heparina de litio	0,93 [0,82 a 1,04]	0,73 [-1,49 a 2,95]	0,97
Heparina sódica	0,93 [0,84 a 1,01]	0,64 [-1,00 a 2,28]	0,98
EDTA	0,96 [0,86 a 1,05]	0,65 [-1,19 a 2,49]	0,98

16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*²². Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.
- La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra del paciente puede causar un mayor nivel de unión no específica y dar como resultado falsos positivos en este ensayo.

17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Dusse LM, Silva FD, Freitas LG, Rios DR, *et al.* Antiphospholipid syndrome: a clinical and laboratorial challenge. Rev Assoc Med Bras (1992). 2014 Mar-Apr;60(2):181-6.
2. Roggenbuck D, Somma V, Schierack P, Borghi MO, Meroni PL. Autoantibody profiling in APS. Lupus. 2014 Oct;23(12):1262-4.
3. Banzato A, Pengo V. Clinical relevance of β_2 -glycoprotein-I plasma levels in antiphospholipid syndrome (APS). Curr Rheumatol Rep. 2014 Jun;16(6):424.
4. Amiral J, Peyrafitte M, Dunois C, Vissac AM, Seghatchian J. Anti-phospholipid syndrome: Current opinion on mechanisms involved, laboratory characterization and diagnostic aspects. Transfus Apher Sci. 2017 Aug;56(4):612-625.

5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):295-306.
6. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun.* 2000 Sep;15(2):163-72.
7. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, *et al.*; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr;46(4):1019-27.
8. Linnemann B. Antiphospholipid syndrome - an update. *Vasa.* 2018 Oct;47(6):451-464.
9. Calvo-Alén J, Toloza SM, Fernández M, Bastian HM, *et al.*; LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant, and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul;52(7):2060-8.
10. Janardhan V, Wolf PA, Kase CS, Massaro JM, *et al.* Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham cohort and offspring study. *Stroke.* 2004 Mar;35(3):736-41.
11. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus.* 2002;11(5):269-75.
12. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, *et al.* The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1226-32.
13. Singh AK. Immunopathogenesis of the antiphospholipid antibody syndrome: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 May;10(3):355-8.
14. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep.* 2011 Feb;13(1):70-6.
15. Suh-Lailam BB, Cromar A, Davis KW, Tebo AE. APhL antibody ELISA as an alternative to anticardiolipin test for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(3):210-5.
16. Ofer-Shiber S, Molad Y. Frequency of vascular and pregnancy morbidity in patients with low vs. moderate-to-high titers of antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015 Apr;26(3):261-6.
17. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Jun;7(6):330-9.
18. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1767-73.
19. Sanmarco M, Roll P, Gayet S, Oksman F, *et al.* J. Combined search for anti-beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in antiphospholipid syndrome: contribution to diagnosis. *J Lab Clin Med.* 2004 Sep;144(3):141-7.
20. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, *et al.* Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 2012 Feb;64(2):504-12.
21. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
22. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33.

19. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

20. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM112-7

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR EN IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR EN IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo día do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			