

SISTEMA DE ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA DE TIPO IgG E IgM RELISA®

Para Uso Diagnóstico In Vitro

Para El Uso Profesional

Número de catálogo: 7096-02 (96 pocillos) y 7696-02 (576 pocillos)

USO PREVISTO: Se trata de un sistema de análisis inmunoenzimático (EIA) para la detección y medición de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG e IgM en suero humano. Este sistema de análisis debe servir de ayuda para evaluar el riesgo de sufrir trastornos tromboticos en individuos con lupus eritematoso sistémico o con síndromes similares al lupus.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

En pacientes con lupus eritematoso sistémico es frecuente detectar anticuerpos antifosfolípidos, incluidos los anticuerpos anticardiolipina (1). En numerosos informes estos autoanticuerpos han sido asociados a diversos trastornos tromboticos venosos y arteriales, como el infarto cerebral (2), la trombosis venosa profunda (3), la trombocitopenia (1), la embolia pulmonar (4) y el aborto recurrente con infarto placentario (5). El “anticoagulante lúpico” (6), una sustancia que prolonga in vitro el tiempo parcial de tromboplastina activada, también se ha asociado a estos síndrome clínicos, aunque no es idéntico al anticuerpo anticardiolipina. En ocasiones los términos “anticoagulante lúpico” y “anticuerpos antifosfolípidos” se emplean como sinónimos, lo cual es incorrecto porque estas inmunoglobulinas no son lo mismo (1).

El sistema de análisis de Immuno Concepts es una prueba inmunoenzimática con micropocillos para la detección de anticuerpos anticardiolipina en suero humano. Anteriormente se ha demostrado que el inmunoanálisis en fase sólida es un método extremadamente sensible y específico para la detección de anticuerpos anticardiolipina (7-10). El sistema de análisis de Immuno Concepts ha sido estandarizado mediante un preparado de referencia reconocido internacionalmente, obtenido del Antiphospholipid Standardization Laboratory y que se denomina “estándar de Harris” (9). Los resultados objetivos obtenidos en esta prueba se expresan en unidades GPL para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG, y en unidades MPL para los de tipo IgM.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Se trata de un EIA indirecto. La superficie de los micropocillos ha sido recubierta con un preparado estabilizado de cardiolipina, que actúa como antígeno en este sistema. Se dispone suero calibrador, controles y las muestras diluidas de pacientes en los micropocillos, y se incuban permitiendo que los anticuerpos anticardiolipina de la muestra reaccionen con el antígeno de la fase sólida. Tras lavar para retirar el anticuerpo no ligado y otras proteínas del suero, se incuban los pocillos con anticuerpos anti-IgG humana o anti-IgM humana, marcados con peroxidasa de rábano. En el sistema de análisis se incluyen dos preparaciones de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano. Una de ellas es específica de la IgG humana, y la otra de la IgM humana. Con estos dos conjugados se determinarán por separado las concentraciones de los anticuerpos anticardiolipina IgG y de los anticuerpos anticardiolipina IgM.

Tras la incubación con los conjugados de peroxidasa de rábano, y si los resultados son positivos, se forma un complejo estable con tres partes, a saber: anticuerpo antihumano conjugado con peroxidasa de rábano unido al anticuerpo anticardiolipina humano, unido a su vez a la cardiolipina estabilizada en la superficie de plástico.

Tras otro paso de lavado, se detecta el complejo añadiendo una solución de tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂ como sustrato cromógeno. El grado de aparición del color en cada pocillo es proporcional a la concentración de anticuerpos anticardiolipina en cada muestra de suero.

Los micropocillos son interpretados con un espectrofotómetro, y los resultados se obtienen comparando la absorbancia de los pocillos con calibrador con la absorbancia de los pocillos con muestra.

COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

Conservación: Todos los componentes deben conservarse en refrigerador a 2-10°C. No congelar.

Estabilidad: Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Tiras de micropocillos recubiertos con cardiolipina **PLATE:** No. de catálogo 7008-01. Contiene un soporte de micropozos con doce tiras de ocho pozos cada una, recubiertos con una solución estabilizada de difosfatidilglicerol (cardiolipina) de corazón de ternera. Si se necesitan menos de 8 pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito disecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.

Disolvente para muestras **SOLN|DIL:** Número de catálogo 7100 (100 ml). Disolvente para muestras tamponado patentado, para disolver las muestras de los pacientes. Este disolvente contiene cofactor H de apolipoproteína.

Control positivo de anticuerpos anticardiolipina IgG **CONTROL|+:** Número de catálogo 7021-02G. Vial que contiene 1,5 ml de suero de control humano positivo para anticardiolipina, listo para usar. Este suero contiene anticuerpos anticardiolipina IgG. En la etiqueta del vial figuran los rangos de GPL previstos.

Control positivo de anticuerpos anticardiolipina IgM **CONTROL|+:** Número de catálogo 7021-02M. Vial que contiene 1,5 ml de suero de control humano positivo para anticardiolipina, listo para usar. Este suero contiene anticuerpos anticardiolipina IgM. En la etiqueta del vial figuran los rangos de MPL previstos.



Control negativo de anticuerpos anticardiolipina **CONTROL|-:** Número de catálogo 7031-01. Vial que contiene 2 ml de suero de control humano negativo para anticardiolipina, listo para usar. Los valores de GPL y MPL previstos son inferiores a 5,0 unidades.



Calibrador de anticuerpos anticardiolipina IgG **CAL:** Número de catálogo 7026-02G. Vial que contiene 1,5 ml de suero calibrador positivo para anticardiolipina humana IgG estable líquida, listo para usar. En la etiqueta del vial figura la concentración de anticuerpos anticardiolipina en unidades GPL.

Calibrador de anticuerpos anticardiolipina IgM **CAL:** Número de catálogo 7026-02M. Vial que contiene 1,5 ml de suero calibrador positivo para anticardiolipina humana IgM estable líquida, listo para usar. En la etiqueta del vial figura la concentración de anticuerpos anticardiolipina en unidades MPL.

Reactivo enzimático para anticuerpos - Específico de la IgG humana **CONJ|HRP:** Número de catálogo 7009-02G (14 ml). IgG antihumana, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Listo para usar.

Reactivo enzimático para anticuerpos - Específico de la IgM humana **CONJ|HRP:** Número de catálogo 7009-02M (14 ml). IgM antihumana, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Listo para usar.

Solución de sustrato **SOLN|SUB**   : Número de catálogo 7035 (14 ml). Solución de sustrato enzimático específica de HRP, que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Listo para usar.
PRECAUCIÓN: Inflamable. Este reactivo contiene menos de 25% de metanol y acetona. Manténgalo fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico.

Reactivo de parada **SOLN|STOP**   : Número de catálogo 7033 (14 ml). Reactivo de parada patentado para los sistemas de análisis EIA de Immuno Concepts. Listo para usar. **PELIGRO:** Corrosivo. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Soporte para micropocillos

Tampón PBS [PWDR|PBS]: N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. Se suministran dos bolsas de polvo tampón con cada placa de 96 micropocillos, en kits de análisis completos.

Preparación: Disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada, tápelo el recipiente y almacenar entre 2 y 25° C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles. NO AÑADA TWEEN 20 NI OTROS DETERGENTES A ESTE TAMPÓN.

OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas de precisión para dispensar volúmenes de 10-1000 µl
Frasco flexible para añadir tampón de lavado a los micropocillos, o un sistema de lavado automático para micropocillos
Envases de un litro para el tampón PBS
Agua desionizada o destilada
Espectrofotómetro de lectura de placas capaz de interpretar absorbancia a 450 nm
Probetas para preparar las diluciones de suero
Papel secante o toallas de papel
Pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos
Guantes desechables
Cronómetro

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos homologados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso todos los materiales del kit deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todos los sueros de control, los sueros de calibración y las muestras de pacientes deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. En los sueros de control y calibración se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con las conducciones de plomo o cobre y formar sales de azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
4. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
5. No inactive por calor las muestras de suero utilizadas para determinar los anticuerpos anticardiolipina. La inactivación por calor puede hacer que aumenten los valores.
6. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
7. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.
8. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
9. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
10. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
11. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos. Las muestras deben permanecer en los micropocillos durante el análisis.
12. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
13. Todos los reactivos, micropocillos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
14. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
15. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
16. El reactivo de parada es corrosivo y puede producir quemaduras. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención: La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

Immuno Concepts no recomienda utilizar plasma en este análisis, dada la posibilidad de que el plasma se contamine con plaquetas. Las plaquetas pueden afectar a los resultados, reaccionando con los anticuerpos anti-fosfolípidos.

PRECAUCIÓN: *No inactive por calor las muestras de suero utilizadas para determinar los anticuerpos anticardiolipina. La inactivación por calor puede hacer que aumenten los valores.*

Sustancias que interfieren: No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados aberrantes. Si la muestra presenta partículas visibles, deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

Conservación: Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

PRECAUCIÓN: *Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.*

OBSERVACIONES GENERALES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Es muy importante que todos los componentes del kit y las muestras de suero estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de utilizarlos. Para que un litro entero de tampón de lavado sacado del refrigerador alcance los 20°C, puede ser necesario calentar durante varias horas. Si las temperaturas de incubación son superiores o inferiores a las recomendadas puede que los resultados no sean precisos. Las muestras y reactivos no utilizados deben ser devueltos al refrigerador.
2. Mezcle bien los reactivos antes de utilizarlos, dando la vuelta al envase con suavidad. No agite ni remueva los reactivos. Evite que se forme espuma.
3. Para preparar las diluciones de muestras, limpie la punta de las pipetas antes de utilizarlas para poner suero en el disolvente. Si queda muestra adherida al exterior de la punta de la pipeta, los resultados pueden variar.
4. Se recomienda utilizar una pipeta multicanal porque con ella la dispensación del reactivo y los tiempos de incubación y reacción son más uniformes.
5. **Es extremadamente importante lavar bien los pocillos.** Si no es así, los valores de fondo serán muy elevados, lo que se puede traducir en resultados falsos positivos. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado. Se recomienda utilizar un sistema de lavado automático de los micropocillos, ya que así su limpieza queda garantizada.
NOTA: Como existen diversas técnicas de lavado y de sistemas automáticos, hay que ajustar el número de lavados para que los resultados sea óptimos. Cada laboratorio determinará el número de lavados más eficaz para su sistema de lavado.
6. Si no se elimina todo el tampón puede que la aparición de color no sea homogénea. Para ello, hay que limpiar con fuerza las tiras de micropocillos, secándolas con papel secante o toallas absorbentes.
7. El tiempo de cada paso es fundamental. Antes de iniciar el procedimiento se disolverán las muestras de suero, que deben ser dispuestas en los micropocillos en el menor tiempo posible (no más de cinco minutos). Los tamaños de lote deben determinarse de forma que se puedan manipular las muestras en este período de tiempo con comodidad.
8. A excepción de la última incubación (solución de sustrato), cada período de incubación empieza al finalizar la dispensación de la muestra o el reactivo. La incubación de la solución de sustrato debe durar exactamente 15 minutos para cada pocillo. Todas las muestras y reactivos deben dispensarse con la misma secuencia y a velocidad constante.
9. No utilice Tween 20, Triton X-100, ni otros detergentes en los tampones de lavado u otros reactivos utilizados en este análisis.

RISULTADOS

CÁLCULOS

1. Reste el valor de la absorbancia del pocillo sin IgG, de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de calibración de IgG, control y muestra del paciente. Reste el valor de la absorbancia del pocillo sin IgM de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de calibración de IgM, control y muestra del paciente. Calcule los valores medios de la absorbancia en pocillos duplicados.
2. Para obtener el factor de conversión, se divide la concentración de anticuerpos anticardiolipina del suero de calibración (que figura en la etiqueta) por el valor medio de la absorbancia medida en los pocillos de calibración. Se calculan factores de conversión distintos para la IgG y la IgM.
3. Para obtener la concentración de anticuerpos anticardiolipina en unidades GPL o MPL, se multiplican los valores de la absorbancia de cada muestra por el factor de conversión.

CONTROL DE CALIDAD

1. El valor medio de la absorbancia de los pocillos de calibración debe ser de 0,400 como mínimo.
2. El pocillo de control vacío debe presentar un valor de absorbancia inferior a 0,150. Si los valores de absorbancia en el pocillo vacío son superiores a 0,150, ello indica que el lavado no ha sido adecuado o que se han contaminado los reactivos.
3. Los valores del anticuerpo anticardiolipina obtenidos para los sueros de control positivo y negativo deben estar dentro de los límites que se indican en las etiquetas. Estos límites han sido establecidos de forma que engloben el 95% de los valores previstos, según la variación estadísticamente normal. Cabe esperar que se produzcan pequeñas desviaciones ocasionales con respecto a estos límites. Cada laboratorio establecerá sus propios criterios para aceptarlas o rechazarlas, en función de su experiencia con esta prueba.
4. Las muestras que presenten valores de anticuerpos anticardiolipina por encima del rango superior del calibrador deberán ser reportadas como positivas con un valor "mayor a o igual al" valor estipulado en la etiqueta del calibrador.
5. Es necesario calcular el factor de conversión en cada ciclo. Si se emplea el de otro ciclo o se intercambian los factores de conversión de GPL y MPL, los resultados no serán válidos.
6. Cada laboratorio deberá establecer y mantener sus propios rangos de referencia (normal), en función de la población de pacientes y de otros factores locales. Véase "Características del rendimiento, Especificidad clínica" como ejemplo.

VALORES ESPERADOS

Rangos de referencia

La significancia clínica de los anticuerpos anticardiolipina sigue siendo objeto de investigación. Sin embargo, la mayoría de los investigadores convienen que la significancia clínica del hallazgo de niveles bajos de los anticuerpos anticardiolipina es poco concluyente (17, 18).

De acuerdo con los resultados de nuestros estudios (véase "características de funcionamiento"), y la observación que los pacientes con el síndrome de Antifosfolípido tienen generalmente niveles medios a altos de anticuerpos anticardiolipina (17), Immuno Concepts recomienda los siguientes rangos de referencia:

- Nivel Alto = Sobre 80 GPL o unidades MPL
- Nivel Moderado = 20 a 80 GPL o unidades MPL
- Nivel Normal = Menos de 20 GPL o unidades MPL

Se sugiere que cada laboratorio realice un estudio normal para establecer su rango de referencia.

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS PREVISTA

La asociación entre los anticuerpos anticardiolipina y el lupus eritematoso sistémico ha sido demostrada en numerosos estudios (1, 7, 8, 11-16). En estos estudios, la prevalencia de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG fue del 23% al 54% (media del 41,4%) y la prevalencia de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM fue del 5% al 41% (media del 25,5%). Probablemente las diferencias en la prevalencia que se observan en estos estudios se deben a los criterios de selección de los pacientes, a la población estudiada o a los niveles de anticuerpos que se consideraron significativos. Se utilizó el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de Immuno Concepts para evaluar muestras de suero de 58 pacientes atendidos en consultas de reumatología. Esta población de pacientes fue elegida por padecer enfermedades reumáticas clínicas, pero no por una enfermedad concreta ni por presentar antecedentes trombóticos.

En esta población, 56 muestras (96,6%) fueron negativas para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG (27 muestras con menos de 5 unidades GPL, y 29 muestras con 5-20 unidades GPL), dos muestras presentaron niveles moderados (3,4%) y ninguna dio niveles elevados. Una muestra (1,7%) dio positivo para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM a nivel moderado.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos anticardiolipina. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos anticardiolipina. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Si el paciente da negativo para los anticuerpos anticardiolipina pero los hallazgos clínicos sugieren la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, algunos investigadores recomiendan evaluar el anticoagulante lúpico para confirmar los resultados negativos para los Ac anticardiolipina. Si los anticuerpos anticardiolipina o el anticoagulante lúpico dan positivo, se considera que el paciente es positivo para los anticuerpos antifosfolípidos (1).
4. Los pacientes con sífilis serológicamente positiva pueden dar positivo en el análisis de anticuerpos anticardiolipina. En general, se considera que estos pacientes no presentan un aumento del riesgo de trombosis, como se observa en los pacientes reumáticos con anticuerpos anticardiolipina. Se evaluaron diecisiete muestras de pacientes con sífilis activa o serológica confirmada (Ac FTA y/o MHA-TP positivas) mediante el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG e IgM RELISA® de Immuno Concepts. Doce (70,6%) de estas muestras dieron positivo para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG, y tres (17,6%) para los de tipo IgM, además de los anticuerpos de tipo IgG. El diagnóstico de sífilis debe ser confirmado o descartado mediante la prueba concreta de anticuerpos antitreponema.
5. Muchas infecciones pueden provocar la presencia transitoria de anticuerpos anticardiolipina. Si un paciente da positivo mientras presenta signos clínicos de infección, se repetirá la prueba cuando la infección haya desaparecido.
6. El factor reumatoide puede interferir con las pruebas de detección de anticuerpos IgM en fase sólida, ofreciendo resultados falsos positivos.
7. En estudios publicados sobre pacientes con lupus eritematoso sistémico, se ha informado de que la prevalencia de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG fue del 23% al 54%, y la de tipo IgM, del 5% al 41%.
8. La importancia clínica de los anticuerpos anticardiolipina sigue siendo objeto de investigación. El nivel de anticuerpos detectado con este sistema de análisis no indica necesariamente la intensidad o la duración de la enfermedad.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Controles normales: Se aplicó el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de Immuno Concepts a las muestras de suero de 330 donantes de sangre sanos. En este grupo de individuos, 327 muestras (99,1%) fueron negativas para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG (246 muestras con menos de 5 unidades GPL, y 81 muestras con 5-20 unidades GPL), 3 muestras presentaron niveles moderados (0,9%) y ninguna dio niveles elevados. Al medir la IgM, 329 muestras (99,7%) fueron negativas para los anticuerpos anticardiolipina de ese tipo (318 muestras con menos de 5 unidades GPL, y 11 muestras con 5-20 unidades GPL), una presentó niveles moderados (0,3%) y ninguna dio niveles elevados.

Controles de enfermedades reumáticas: Se aplicó el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de Immuno Concepts a muestras de suero de 20 pacientes con enfermedades reumáticas distintas del LES y sin antecedentes de episodios trombóticos. Ninguna de las muestras dio positivo para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG ni IgM.

SENSIBILIDAD CLÍNICA

Se utilizó el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de Immuno Concepts para evaluar muestras de suero de 58 pacientes atendidos en consultas de reumatología. Esta población de pacientes fue elegida por padecer enfermedades reumáticas clínicas, pero no por una enfermedad concreta ni por presentar antecedentes trombóticos. En esta población, 56 muestras (96,6%) fueron negativas para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG (27 muestras con menos de 5 unidades GPL, y 29 muestras con 5-20 unidades GPL), dos muestras presentaron niveles moderados (3,4%) y ninguna dio niveles elevados. Una muestra (1,7%) dio positivo para los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM a nivel moderado.

Estas mismas muestras fueron analizadas con un método anticardiolipina ELISA de referencia, que detectó la presencia de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG en las mismas dos muestras, y los de tipo IgM en la misma muestra que nuestro análisis. Por consiguiente, el sistema de Immuno Concepts demostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% para los anticuerpos anticardiolipina de ambos tipos, en comparación con el método de referencia.

Se aplicó el sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de Immuno Concepts a muestras de suero de 32 pacientes con LES y antecedentes de un episodio trombótico como mínimo. Siete de estas muestras presentaron un nivel moderado de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG. Además de los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG, una muestra presentó un nivel moderado de tipo IgM.

PRECISIÓN

Se evaluaron ocho muestras con valores conocidos de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG en nueve ocasiones distintas. Para estas muestras, el coeficiente de variación (CV) entre pruebas fue del 6,4% al 10,4% (media de 9,2%), y el CV entre pruebas para los valores en GPL fue del 1,9% al 10,0% (media del 8,7%).

Se evaluaron ocho muestras con valores conocidos de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM en nueve ocasiones distintas. Para estas muestras, el coeficiente de variación (CV) entre pruebas para los valores de la absorbancia fue del 8,0% al 10,0% (media del 8,7%), y el CV entre pruebas para los valores en MPL fue del 6,1% al 10,0% (media del 7,7%). Se tomaron dos muestras positivas para anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG y otras dos positivas para los de tipo IgM, y cada una fue analizada en diez ocasiones. En la Tabla 1 se recogen los resultados del coeficiente de variación (CV) para estas muestras.

TABLA 1

Muestra	Nivel de anticardiolipina	CV entre pruebas (abs)	CV entre pruebas (unidades)
IgG positivo bajo	13 unidades GPL	2,4%	5,1%
IgG positivo moderato	70 unidades GPL	9,6%	7,1%
IgM positivo bajo	9 unidades MPL	5,0%	11,5%
IgM positivo moderato	25 unidades MPL	9,5%	7,0%

RECUPERACIÓN

Se disolvieron dos muestras con niveles de GPL conocidos (una con nivel bajo y otra con nivel moderado) con partes iguales de estándares que contenían cantidades conocidas de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG. En la Tabla 2 se recogen los datos calculados, observados y de recuperación.

TABLA 2

Muestra	GPL calculado	GPL observado	Recuperación (%)
Positivo bajo	-	9,0	-
Positivo bajo +10	10	11,0	110
Positivo bajo +20	14,5	14,3	99
Positivo bajo +40	24,5	25,3	103
Positivo bajo +60	34,5	35,7	103
Positivo moderato	-	54,0	-
Positivo moderato +10	32,0	32,3	101
Positivo moderato +20	37,0	38,1	103
Positivo moderato +40	47,0	46,4	99
Positivo moderato +60	57,0	57,7	101

Se disolvieron dos muestras con niveles de MPL conocidos (una con nivel bajo y otra con nivel moderado) con partes iguales de estándares que contenían cantidades conocidas de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM. En la Tabla 3 se recogen los datos calculados, observados y de recuperación.

TABLA 3

Muestra	MPL calculado	MPL observado	Recuperación (%)
Positivo bajo	-	8,0	-
Positivo bajo +5	7,5	7,3	97
Positivo bajo +10	9,0	9,2	102
Positivo bajo +20	14,0	14,3	102
Positivo bajo +30	19,0	18,8	99
Positivo moderato	-	25,0	-
Positivo moderato +5	15,0	14,5	97
Positivo moderato +10	17,5	17,9	103
Positivo moderato +20	22,5	22,1	98
Positivo moderato +30	27,5	27,8	101

BIBLIOGRAFICI

1. Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anti-phospholipid Antibodies. Clin. Rheum. Dis. 11:591-609, 1985.
2. Harris, E.N., Gharavi, A.E., Asherson, R.A., et al. Cerebral infarction in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. Clin. Exp. Rheumatol. 2:47-51, 1984.
3. Mueh, J.R., Herbst, K.D., Rapaport, S.I. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann. Intern Med. 92:156-159, 1980.
4. Anderson, N.E., Ali, M.R. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism and fatal pulmonary hypertension. Ann. Rheum. Dis. 43:760-763, 1984.
5. Derue, G.J., Englert, H.J., Harris, E.N., et al. Fetal loss in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. J. Obstet. Gynaecol. 5:207-209, 1985.
6. Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., Elkon, K.B., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Brit. Med. J. 287:1021-1023, 1983.
7. Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin Antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet ii:1211-1214, 1983.
8. Loizou, S., McCrea, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., and Harris, E.N. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Immunol 62:738-745, 1985.
9. Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arth. Rheum. 30:835-837, 1987.
10. Harris, E.N. Solid-phase anticardiolipin test revisited. Am. J. Med. 85:599-601, 1988.
11. Colaco, C.B., Male, D.K. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. Clin. Exp. Immunol. 59:449-456, 1985.
12. McHugh, N.J., Maymo, J., Skinner, R.P., James, I., and Maddison, P.J. Anticardiolipin antibodies, livedo reticularis, and major cerebrovascular and renal disease in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 47:110-115, 1988.
13. Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H., and Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 56:193-199, 1984.
14. Cronin, M.E., Biswas, R.M., Van der Straeten, C., Fleisher, T.A., and Klippel, J.H. IgG and IgM Anticardiolipin Antibodies in Patients with Lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol. 15:795-798, 1988.
15. Sturfelt, G., Nived, O., Norberg, R., Thorstensson, R., and Krook, K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 30:382-388, 1987.
16. Ishii, Y., Nagasawa, K., Mayumi, T., and Niho, Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 49:387-390, 1990.
17. Wilson, W. A., Gharavi, A.E., Koike, T., Lockshin, M.D., Branch, D.W., Piette, J.C., Brey, R., Derksen, R., Harris, E.N., Hughes, G.R., Triplett, D.A., and Khamashta, M.A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arth. Rheum. 42:1309-1311, 1999.
18. Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H.W.M., de Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Kriolis, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 4:295-306, 2006.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



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

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ANTICUERPOS CARDIOLIPINA IgG ET IGM RELISA®

Todas las muestras (incluida la solución tampón de lavado) y los micropocillos deben estar a temperatura ambiente antes de su empleo.

- 1. PREPARACIÓN DE LA HOJA DE TRABAJO**
Marque la hoja de trabajo que se adjunta con el kit, para indicar la localización de las muestras en los micropocillos. Habrá un pocillo vacío en las determinaciones de IgG y otro en las de IgM.
Recomendamos que todas las determinaciones de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG e IgM en muestras de pacientes, en el calibrador y en el control se analicen por duplicado, hasta que se alcance una precisión aceptable en su laboratorio.
- 2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO (PBS)**
Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada. El tampón PBS se puede tapar y conservar a 2-25°C durante cuatro semanas como máximo.
- 3. MUESTRAS DE PACIENTES DILUIDAS**
Disuelva las muestras de pacientes a 1:100 añadiendo 10 µl de suero a 990 µl de disolvente de muestras. Mezcle bien. Los controles y el calibrador se entregan a la dilución de trabajo, por lo que no es necesario disolverlos.
- 4. PREPARACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS**
Saque de la bolsa el número requerido de tiras de micropocillos y colóquelos en el soporte provisto. Los micropocillos deben quedar firmemente sujetos en el soporte. Precione firmemente ambos lados de cada tira de forma que encajen bien dentro del soporte. Si emplean pocillos individuales o menos de una tira completa de pocillos asegúrese de que queden bien encajados. Los pocillos que están bien encajados no se caerán si voltea el soporte al revés. Si se necesitan menos de ocho pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito desecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.
- 5. DISPENSACIÓN DE LAS DILUCIONES DE SUERO**
Ponga 100 µl del calibrador, los controles y las muestras de pacientes en los pocillos correspondientes, como se describe en la hoja de trabajo. Ponga 100 µl de disolvente de muestras en el pocillo que no llea reactivo.
- 6. INCUBACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**
Incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea, se pueden tapar los pocillos con cinta transparente o con toallas de papel para protegerlos del polvo u otros cuerpos extraños.
- 7. LAVADO DE LOS MICROPOCILLOS (véanse las Observaciones generales sobre el procedimiento 5 y 6)**
Lave los pocillos de 3 a 5 veces con solución tampón de lavado PBS. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.
- 8. DISPENSACIÓN DE REACTIVO CON ANTICUERPOS ENZIMÁTICOS**
Ponga 100 µl de reactivo con anticuerpos enzimáticos anti-IgG en los siguientes pocillos: sin IgG, calibrador de GPL, controles de IgG y muestras de IgG de los pacientes. Ponga 100 µl de reactivo con anticuerpos enzimáticos anti-IgM en los siguientes pocillos: sin IgM, calibrador de MPL, controles de IgM y muestras de IgM de los pacientes.
- 9. INCUBACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**
Incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea, se pueden tapar los pocillos con cinta transparente o con toallas de papel para protegerlos del polvo u otros cuerpos extraños.
- 10. LAVADO DE LOS MICROPOCILLOS**
Lave los pocillos de 3 a 5 veces con solución tampón de lavado PBS. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.
- 11. DISPENSACIÓN DE LA SOLUCIÓN SUSTRATO**
Utilizando un cronómetro para que los intervalos sean homogéneos, ponga 100 µl de solución de sustrato en cada pocillo. La solución de sustrato se incorporará a los pocillos a velocidad constante, de forma que todos se sometan al mismo tiempo de incubación (15 minutos). La solución de sustrato incubada en pocillos con muestras positivas se volverá de color azul, y si son muestras negativas, serán incoloras o de azul muy claro.
- 12. INCUBACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS (15 minutos exactamente a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**
Incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos exactamente. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos.
- 13. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO DE PARADA**
Cuando el primer pocillo haya sido incubado durante 15 minutos exactos, añada 100 µl de reactivo de parada a cada pocillo, en el mismo orden y a la misma velocidad en que se añadió la solución de sustrato a los pocillos. Tras añadir el reactivo de detención, la solución de sustrato azul se volverá amarilla y la incolora permanecerá tal cual.
- 14. INTERPRETACIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LOS POCILLOS**
En los treinta minutos siguientes a la adición del reactivo de parada, los pocillos deben ser medidos en un espectrofotómetro de lectura de placas. Los pocillos se medirán a 450 nm, frente al pocillo sin reactivo. Si se dispone de un espectrofotómetro con doble longitud de onda, la del filtro de referencia debe ser de 600-650 nm. Si se leen los micropocillos a 450 nm sin filtro de referencia, los valores de la absorbancia serán más elevados.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com