

Immunoensayo para determinar Anticuerpos IgG para Cardiolipina

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en Laboratorios Clínicos o de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C

RESUMEN Y PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Paso	Temp. ambiente 20 - 25°C	Volumen	Tiempo de incubación
1	Dilución de la muestra 1:101 (5µL / 500µL)		
2	Buffer de lavado (3 veces)	350 µL	
3	Muestras diluidas, controles y calibrador	100 µL	30 minutos
4	Buffer de lavado (3 veces)	350 µL	
5	Enzima conjugada	100 µL	30 minutos
5	Buffer de lavado (3 veces)	350 µL	
6	TMB Substrato Cromogénico	100 µL	30 minutos
7	Solución de paro	100 µL	
8	Lectura a una densidad óptica de 450 nm		

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos anticardiolipina (ACA) son frecuentemente encontrados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE). Estos también son encontrados en pacientes con otras enfermedades autoinmunes así como en algunos individuos sin enfermedades subyacentes anteriores evidentes.

Elevados niveles de ACA han sido reportados al ser significativamente asociados con la presencia de trombosis venosa y arterial, trombocitopenia y recurrente pérdida fetal. El síndrome anti-fosfolípido ha sido usado para describir a pacientes quienes presentan estas manifestaciones clínicas en asociación con ACA o anticoagulante lúpico.

ACA son encontrados en las inmunoglobulinas clases IgG, IgM e IgA. La determinación de anticuerpos IgM es un valioso indicador en el diagnóstico del principio de la enfermedad autoinmune, considerando que los anticuerpos IgG serán encontrados en etapas progresivas de desórdenes autoinmunes manifestados. ACA IgG muestra una buena correlación con el estado clínico del paciente con trombosis, trombocitopenia, pérdida fetal y algunos desórdenes neurológicos. ACA IgA es frecuentemente asociado con anticuerpos IgG. ACA IgA parece tener una gran validez en trombosis y pérdida fetal. Pruebas para ACA de varios isotipos por Elisa ayudan en el diagnóstico del síndrome anti-fosfolípido (SAF) en pacientes con SLE y algunos desordenes asociados.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Antígenos cardiolipina purificados son revestidos en la superficie de los micropozos. El suero o plasma del paciente es diluido y los calibradores son añadidos a los pozos. Los anticuerpos específicos anticardiolipina, si se encuentran presentes se unirán a los antígenos. Todos los materiales no unidos son lavados Después de añadir la enzima conjugada, esto la unirá al complejo antígeno – anticuerpo. El exceso de enzima conju-

gada es lavada y el substrato cromogénico (TMB) es añadido. La reacción catalítica de la enzima conjugada catalítica, es parada a un tiempo específico. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos en la muestra. Los resultados son leídos por un lector de microtira, y comparados de manera paralela con los calibradores.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Tiras de micropozos cubierto con antígeno Cardiolipina (12 x 8)
2. Diluyente de muestras. 1 Frasco
3. Concentrado de buffer de lavado 20x. 1 Frasco
4. TMB substrato cromogénico. 1 Frasco
5. Enzima conjugada. 1 Frasco
6. Juego de calibrador, prediluidos (1:101) que contienen 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 GPL. 1 Vial c/u
7. Juego de controles (1:101 prediluidos) Controles Positivo y Negativo con rangos indicados en cada etiqueta. 1 vial c/u
8. Solución de paro. 1 Frasco

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales potencialmente bio-peligrosos: Los calibradores y controles contienen componentes de fuente humana, los cuales han sido probados y encontrados no reactivos para hepatitis B antígeno de la superficie así como anticuerpos HIV con licencia de reactivos de la FDA. Sin embargo, como no hay ningún método de prueba que pueda ofrecer el aseguramiento completo que el VIH, el virus de Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes, estos reactivos deben ser manejados al Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales del manual de Salud, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos." 1984.
2. No utilice la pipeta oralmente. No fume, coma, ni beba en las áreas en las cuales los especímenes o los reactivos del equipo de prueba están manejándose.
3. Los componentes en este equipo de prueba están destinados para su uso como una unidad integral. Los componentes de lotes diferentes no deben ser mezclados.
4. Este producto contiene compuestos conservados con ázida sódica. La ázida sódica podría reaccionar con plomerías de plomo o cobre para formar ázida metálica explosiva. Para desecharlo, enjuague con un gran volumen de agua.
5. Para prevenir lesiones y quemaduras químicas, evitar contacto con piel y ojos o inhalación e ingestión de los siguientes reactivos: enzima conjugada, substrato cromogénico (TMB) y solución de paro.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. Recolecte la muestra y separe el suero.
2. Las muestras pueden ser refrigerados a 2-8 °C por hasta 7 días o congelados por hasta seis meses. Evite el congelado y descongelado repetitivo de la muestra de suero.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

ALMACENAMIENTO DEL EQUIPO DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

1. Almacene el equipo de prueba de 2-8 °C.
2. Después de abrir la bolsa. Los pozos restantes deben ser cuidadosamente guardados nuevamente en la bolsa con desecantes. Es recomendable utilizar todos los pozos en un plazo de 30 días.
3. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad del equipo de prueba
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, sol, o luz fuerte durante el almacenaje o uso.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Traiga todas las muestras y reactivos del equipo de prueba a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y mezcle cuidadosamente.
2. Prepare buffer de lavado 1x. Añada agua destilada o desionizada al buffer concentrado 20x, para lograr un volumen final de 1 litro.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Coloque el número deseado de tiras cubiertas en el soporte.
PRE-LAVADO de pozos cubiertos - Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.
2. Prepare dilución 1:101 de muestras al añadir 5 µL de la muestra a 500 µL de diluyente de la muestra. Mezcle bien. **No diluya controles y calibradores, se encuentran prediluidos.**
3. Agregue 100 µL de suero diluido y calibradores y controle pre-diluidos dentro de los pozos apropiados. Golpear ligeramente el soporte para quitar burbujas de aire del líquido y mezclar bien. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Remueva el líquido de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.
5. Agregue 100 µL de enzima conjugada a cada pozo e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Remueva la enzima conjugada de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.
7. Agregue 100 µL de TMB Substrato Cromogénico en cada pozo e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µL de solución de paro para detener la reacción.
Asegúrese que no haya burbujas de aire en los pozos antes de la lectura
9. Lea a 450 nm de DO (Densidad Óptica) con un lector de micro pozos

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Construya una curva estándar al trazar la DO a 450 nm en el eje "Y" contra los valores de la concentración de calibrador GPL sobre el eje "X" en papel cuadrado.
2. Usando el valor de la DO de cada muestra, determine la concentración desde la curva estándar.
3. Un ejemplo típico:

Calibradores	Cardiolipina IgG (GPL)	O.D. 450 nm		O.D. 450 nm (Media)	SD	CV (%)
Calibrador 1	6.3	0.267	0.240	0.254	0.019	7.531
Calibrador 2	12.5	0.443	0.456	0.450	0.009	2.045
Calibrador 3	25	0.826	0.835	0.831	0.006	0.766
Calibrador 4	50	1.220	1.159	1.190	0.043	3.626
Calibrador 5	100	1.612	1.650	1.631	0.027	1.647
Calibrador 6	200	2.021	2.035	2.028	0.010	0.488

CONTROL DE CALIDAD

1. El control negativo y control positivo deben procesarse con cada lote de muestras analizadas y la concentración debe estar dentro del rango establecido en la etiqueta.
2. El valor de la O.D. del diluyente de muestras (0 GPL) debe ser inferior a 0.150 y el valor de la O.D. del calibrador 200 GPL debe ser superior a 0.750. *Controles adicionales se pueden preparar a partir de muestras de suero humano y deben mantenerse a -20°C*

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Negativo:	<10 GPL
Bajo Positivo:	10 - 19 GPL
Moderado Positivo:	20 - 79 GPL
Alto Positivo:	>80 GPL

VALORES ESPERADOS

Niveles elevados de ACA son raras veces observados en la población normal. Sin embargo, varias enfermedades autoinmunes e infecciosas pueden resultar transitorias o incrementos crónicos en ACA. Niveles elevados de ACA han sido reportados en SLA, artritis reumatoide, tuberculosis, síndrome de Behcet's y otras enfermedades. El rango normal de valores de ACA, pueden variar de población a población

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Un total de 72 muestras de diferentes fuentes se analizaron con Anti-Cardioplipin IgG comparándolo con otro kit de ELISA disponible en el mercado.

		ELISA DE REFERENCIA		
		N	P	Total
Anti-Cardioplipin IgG	N	27 (D)	18 (B)	45
	P	0 (C)	27 (A)	27
	Total	27	45	72

Sensibilidad Relativa= $A / (A + B) = 27 / (27 + 18) = 60\%$

Especificidad Relativa= $D / (C + D) = 27 / (0 + 27) = 100\%$

Acuerdo= $(A + D) / (A + B + C + D) =$

$(27 + 27) / (27 + 18 + 0 + 27) = 54 / 72 = 75\%$

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio para determinar la reactividad cruzada de Anti-Cardioplipin IgG con otros anticuerpos IgG. No se encontró reactividad cruzada frente a muestras positivas IgG para Rubeola, CMV, HSV, EBV-VCA, *Toxoplasma gondii*, dsDNA, *Chlamydia trachomatis*, ANA, Dengue y Factor Reumatoide IgM.

PRECISION

La media, SD y el CV (%) se calcularon inter e intra ensayo:

Intra-ensayo	n	Media (GPL)	SD	CV (%)
Suero 1	8	16.3	1.17	7.17
Suero 2	8	33.8	1.25	3.68
Suero 3	8	67.1	4.55	6.78

Inter-ensayo	n	Media (GPL)	SD	CV (%)
Suero 1	8	16.5	1.39	7.94
Suero 2	8	35.9	2.17	6.04
Suero 3	8	69.4	2.83	4.07

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Como en otros ensayos serológicos, los resultados de este ensayo debe ser usado conjuntamente con información disponible de evaluaciones clínicas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. Aunque ACA ha sido asociado con ciertos subconjuntos de SLE, la significancia clínica de ACA en SLE y otras enfermedades bajo investigación

REFERENCIAS

1. Roubey R.A.S. 1996. *Immunology of the antiphospholipid syndrome. Arth. & Rheumatism* 39: 1444-1454.
2. Harris E.N., Ghavari A.E., Hughes G.R.V. 1985. *Anti-phospholipid antibodies. Clin. Rheum. Dis.* 11(3):591.
3. Love P.E., and S.A. Santoro. 1990. *Antiphospholipid antibodies: anti-cardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. Ann. Intern. Med.* 112:682-98.
4. Ghavari A.E., Hanis E.N., Asherson R.A., Hughes G.R.V. 1987. *Anti-cardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. Ann. Rheum. Dis.* 46:1.
5. Harris E.N., Ghavari A.E., Hughes G.R.V. 1985. *Anti-phospholipid antibodies. Clin. Rheum. Dis.* 11(3):591-609.
6. Harris E.N. 1992. *Serological detection of antiphospholipid antibodies. Stroke* 23: [sup1]1-6.
7. Loizou S., McCrear J.O., Rudge A.C., Reynolds R., Boyle C.C., Harris E.N. 1985. *Measurement of anticardiolipin antibodies by and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Immunol.* 62:738-45.
8. Harris E.N. 1995. *The anticardiolipin ELISA test Am. Clinical Lab.* March, 7-8.
9. Weldmann E.E., Wallace O.J., Peter J.B., Knight P.J., Bear M.B., Killenberg J.R. 1988. *Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody Isotypes in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol.* 15:74.
10. Kalunian K.C., Peter J.B., Middlekauf H.R., et al; 1988. *Clinical significance of a single test for anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Am. J. Med.* 85:602-8.
11. Santiago M.B., Cosserme W., Turma M.F., Pinto M.N., Oliveira R.M. 1989. *Anticardiolipin antibodies in patients with infectious diseases. Clin. Rheumatol.* 8:23-28.
12. Pereira R.M.R., Goncalves C.R., Bueno C., de Souza Melrelles E., Cosserme W., de Oliveira R.M. 1989. *Anticardiolipin antibodies in Behcet's syndrome: a predictor of a more severe disease. Clin. Rheumatol.* 8:289-291.
13. Santiago M.B., Stellin R., Gaburo N. Jr., Bueno e., Viana V.S.T., Cosserme W., de Oliveira M. 1990. *Antiphospholipid antibodies in syphilis. Brazilian J. Med. Res.* 23:397-402.
14. Sabbaga J., Neto J.F., Chaddad R., Cecconello, de Oliveira R.M. 1991. *A 'primary' thrombotic syndrome: absence of antiphospholipid antibodies. Clin. Rheumatol.* 10:81-83.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA