

Immunoensayo para Determinar Anticuerpos IgM para Cardiolipina

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete

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	15 minutos
7	Solución de paro	100 µL	
8	Lectura a una densidad óptica de 450 nm		

INTRODUCCIÓN

Los autoanticuerpos 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 (SAF) 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 en pacientes con SLE y algunos desórdenes 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 conjugada 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 IgM específicos en la muestra. Los resultados son leídos por un lector de microtira, y comparados de manera paralela con los calibradores.

ALMACENAMIENTO DEL EQUIPO

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.

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.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Tiras de micropozos cubierto con antígeno Cardiolipina (12 x 8)
2. Diluyente de muestra. 1 Frasco
3. Búfer de lavado concentrado 20x. 1 Frasco
4. TMB substrato cromogénico. 1 Frasco
5. Enzima conjugada. 1 Frasco
6. Juego de calibrador. 1 Vial c/u
7. Juego de 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 compuestos en este equipo de prueba están destinados para su uso como una unidad integral. Los compuestos de lotes diferentes

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

no deben ser mezclados.

- Este producto contiene compuestos conservados con ácida 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.
- 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.

PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

- Prepare buffer de lavado 1x. Añada agua destilada o desionizada al buffer concentrado 20x, para lograr un volumen final de 1 litro.
- Traiga todas las muestras y reactivos del equipo de prueba a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y mezcle cuidadosamente.
- Elabore una curva de calibración: Se recomienda utilizar el calibrador en un plazo máximo de 24 horas. Para el calibrador A (100 MPL), añadir 10 µL del Calibrador Stock a 1 mL de solución absorbente. Prepare los calibradores B, C, D y E con una dilución serial de 500 µL del calibrador A con un volumen igual de la solución absorbente de 50, 25, 12.5 y 6.3 MPL

Calibrador	Añadir	A la Solución Absorbente	MPL
A	Calibrador Stock 10µL	1000 µL	100
B	Calibrador A 500	500	50
C	Calibrador B 500	500	25
D	Calibrador C 500	500	12.5
E	Calibrador D 500	500	6.3

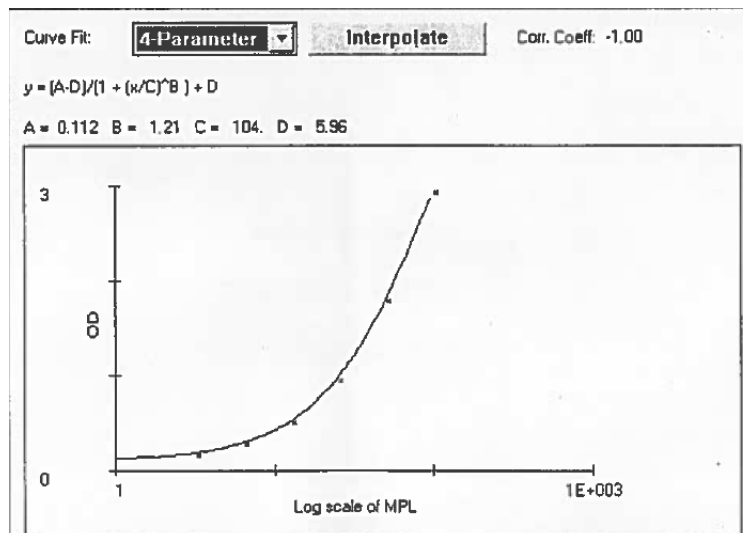
PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Coloque el número deseado de tiras cubiertas en el soporte. **PRE-LAVADO de pozos cubiertos - Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.**
- Prepare dilución 1:101 de muestras al añadir 5 µL de la muestra a 500 µL de diluyente de la muestra. Mezcle bien.
- 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.
- Remueva el líquido de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.
- Agregue 100 µL de enzima conjugada a cada pozo e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Remueva la enzima conjugada de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con buffer de lavado.
- Agregue 100 µL de TMB Substrato Cromogénico en cada pozo e incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 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*
- Lea a 450 nm de DO (Densidad Óptica) con un lector de micro pozos

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Construya una curva estándar al trazar la DO a 450 nm en el eje "Y" contra los valores de la concentración de calibrador MPL sobre el eje "X" en papel logarítmico-logarítmico (log-log) o papel lineal-logarítmico (log-lin)
- Usando el valor de la DO de cada muestra, determine la concentración desde la curva estándar.
- Un ejemplo típico:

Calibradores	Cardiolipina IgM (MPL)	O.D. 450 nm		O.D. 450 nm (Media)	SD	CV (%)
		0.122	0.134			
Calibrador E	6.3	0.122	0.134	0.128	0.008	6.629
Calibrador D	12.5	0.275	0.259	0.267	0.011	4.237
Calibrador C	25	0.443	0.485	0.464	0.030	6.401
Calibrador B	50	0.949	0.926	0.938	0.016	1.735
Calibrador A	100	1.565	1.559	1.562	0.004	0.272



CONTROL DE CALIDAD

- 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.
- El valor de la O.D. del blanco debe ser inferior a 0.150 y el valor de la O.D. del calibrador 100 MPL 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:	<15 MPL
Bajo Positivo:	15 - 25 MPL
Moderado Positivo:	26 - 79 MPL
Alto Positivo:	>80 MPL

VALORES ESPERADOS

La mayoría de los pacientes con trombosis recurrente o pérdida fetal en APS presentan el isotipo IgG con niveles superiores a 40 GPL. Aunque menos frecuente, también existen pacientes con APS IgM con adición de IgG o IgM solo. Los niveles elevados de ACA son observados en población normal con poca frecuencia. Sin embargo, varias enfermedades autoinmunes e infecciosas pueden provocar un aumento transitorio a crónico en los ACA. Los niveles elevados de ACA han sido reportados en SLA, artritis reumatoide, tuberculosis, síndrome de Behcet y otras enfermedades. El rango normal de ACA puede variar de una población a otra.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

REACTIVIDAD CRUZADA

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

PRECISION

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

Intra-ensayo	n	Media (MPL)	SD	CV (%)
Suero 1	8	25.3	3.16	12.5
Suero 2	8	55.8	6.3	11.3
Suero 3	8	87.1	6.9	7.9

Inter-ensayo	n	Media (MPL)	SD	CV (%)
Suero 1	8	26.9	1.39	13.4
Suero 2	8	54.6	6.4	11.8
Suero 3	8	89.8	9.2	10.2

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., Hais 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., McCrea 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., Kllenberg 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., Turna 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., Stelin 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