



APL ELISA™ IgM Kit

REF	LAPL-K-AP-M
-----	-------------

Para la medición de Anticuerpos Anticardiolipina IgM

IVD

Para uso diagnóstico *In Vitro*



Manufacturado por:
Louisville APL Diagnostics, Inc.
702 9TH ST N, STE A
Texas City, TX 77590-7451 USA

Tel: 770-455-7129

Fax: 844-721-8193

Asistencia al Consumidor: 800-624-3192

EEUU & Canadá solamente

Email: support@louisvilleapl.com

Comentarios: feedback@louisvilleapl.com

Website: www.louisvilleapl.com

ES

MANUAL DE INSTRUCCIONES

APL ELISA™ IgM Kit

INDICE

	Página
1 – Uso al que está destinado	4
2 – Explicación del ensayo	4
3 – Principio del método	5
4 – Componentes	6
4.1 Contenido del <i>APL ELISA™ IgM Kit</i>	6
4.2 Precaución.....	7
4.3 Equipamiento necesario para el ensayo, pero no provisto en el kit	8
4.4 Almacenado y conservación del kit	8
5 – Recolección y almacenaje de las muestras.....	8
6 – Instrucciones para la utilización del kit.....	9
6.1 Comentarios preliminares, precauciones y advertencias	9
6.2 Procedimiento detallado de la prueba	9
a. Solución Salina Fosfatada (PBS).....	9
b. Placas.....	10
c. Dilución del Calibrador , Controles y Muestras	10
d. Adición de los calibradores, las muestras y los controles a las placas.....	11
e. Lavado de las placas	11
f. Adición del <i>APL ELISA™ IgM AP Conjugado</i>	11
g. Adición del <i>APL ELISA™ AP Sustrato</i>	11
h. Detención de la reacción del color y lectura.....	12
7 – Resultados	12
7.1 Elaboración de la curva de calibración	12
7.2 Ejemplo de una curva de calibración.....	14
7.3 Resultados esperados	14
8 – Control de calidad	15
9 – Limitaciones.....	15
10 – Características del ensayo	16
10.1 Especificidad.....	16
10.2 Sensibilidad.....	16
10.3 Precisión	17
10.4 Reproducibilidad.....	17
10.5 Recuperación	18
11 – Bibliografía	19

1 – USO AL QUE ESTA DESTINADO

El APL ELISA™ IgM Kit es una prueba de enzimo-inmuno ensayo semi-cuantitativo (ELISA) (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) que se usa para ayudar en el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF), en pacientes que presentan trombosis, pérdidas fetales y/o trombocitopenia. Este ensayo permite medir los niveles de anticuerpos antifosfolípidos tipo IgM en suero o plasma humano.

2 – EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El test de anticardiolipina (1) fue diseñado para el diagnóstico de pacientes con el síndrome antifosfolípido (2). El síndrome antifosfolípido es una enfermedad caracterizada por trombosis venosas o arteriales repetitivas, pérdidas fetales y trombocitopenia asociada con una prueba positiva de anticardiolipina y/o de anticoagulante lúpico (3). Ambas pruebas, la de anticuerpo anticardiolipina y la del anticoagulante lúpico detectan anticuerpos que se unen a fosfolípidos (4-5). Estos anticuerpos son de naturaleza heterogénea, y las dos pruebas no necesariamente identifican los mismos anticuerpos (6-8). Es así que ambas pruebas deben ser realizadas en individuos en los que se sospeche que tienen el síndrome antifosfolípido.

El APL ELISA™ IgM Kit está calibrado en unidades estándar anticardiolipina (MPL) puede ser usado para detectar anticuerpos del tipo IgM.

En adición al calibrador APL ELISA™ IgM Calibrador, se han incluido un control positivo APL ELISA™ IgM Control Positivo con un rango y valor definidos y un control negativo APL ELISA™ Control Negativo como controles internos del ensayo que permiten determinar cuando una prueba en particular es aceptable o no. (9-16)






3 – PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este ensayo se utiliza una técnica estándar de ELISA. El calibrador, los controles y los sueros de los pacientes se incuban en pocillos de placas de poliestireno que han sido cubiertos con el antígeno *APL ELISA™ Antígeno Cardiolipina y β_2 GPI bovina*. Este proceso permite que los anticuerpos anticardiolipina de tipo IgM en el suero o plasma de los pacientes reaccionen con el *APL ELISA™ Antígeno (Cardiolipina asociada con β_2 GPI)* en las placas. El lavado elimina las proteínas no unidas. Se agregan entonces anticuerpos anti-IgM marcados con conjugado de fosfatasa alcalina *APL ELISA™ IgM AP Conjugado*. Después de un lavado adicional, se logra la reacción de color mediante la adición del sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina específico *APL ELISA™ AP Sustrato*. Este proceso produce un cambio de color ante la presencia o ausencia de anticuerpos anticardiolipina que es determinado comparando la densidad óptica de la muestra contra la D.O. de una curva de calibración de 5 puntos a partir de la dilución seriada del calibrador. (9-10)

4 – COMPONENTES

4.1 Contenido del *APL ELISA™ IgM Kit*

Inspeccionar el contenido del *APL ELISA™ IgM Kit* de acuerdo con la siguiente lista:

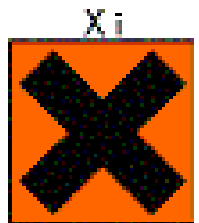
	12 - tiras de poliestireno de 1 x 8 pocillos preparadas con el <i>APL ELISA™ Antígeno Cardiolipina y β_2GPI bovina (APL ELISA™ Placa)</i>	<i>lista para usar</i>
	1 - botella con 30 ml de <i>APL ELISA™ Diluyente de Muestra</i>	listo para usar. *
	1 - vial con 40 μ l de <i>APL ELISA™ IgM Calibrador</i>	para ser diluido en diluyente de muestra para preparar la curva de calibración como se indica. *
	1 - botella con 10 ml de <i>APL ELISA™ IgM AP Conjugado</i>	listo para usar #
	1 - botella con 10 ml de <i>APL ELISA™ AP Sustrato</i>	listo para usar
	1 - botella con 15 ml de <i>APL ELISA™ AP Solución de Paro</i>	listo para usar
	1 - botella con <i>APL ELISA™ AP PBS Concentrado</i>	para ser diluido en * 1000 ml de dH2O.
	1 - vial con 40 μ l de <i>APL ELISA™ Control Negativo</i>	para ser diluido en diluyente de muestra *
	1 - vial con 40 μ l de <i>APL ELISA™ IgM Control Positivo</i>	para ser diluido en diluyente de muestra *

* Contiene 0.2% de azida sódica como conservante

Contiene 0.05% de azida sódica como conservante

4.2 Precaución

- Este producto debe ser utilizado solamente por personal apropiadamente formado.
- El uso de sistemas automáticos, ya sea para diluir muestras, lavar placas o realizar el ensayo deberá ser validado y comparado con el procedimiento manual por el usuario.
- Los materiales de origen humano incluidos en el *APL ELISA™ IgM Kit* han sido testados negativamente contra anticuerpos de HIV-1 y contra el antígeno de superficie de Hepatitis B. Sin embargo, estos materiales y cualquier otro suero para ser analizado deberían tratarse y manipularse con todas las precauciones, como si estuvieran infectados.
- La Azida Sódica en condiciones ácidas se transforma en ácido hidrazoico, que es una sustancia muy tóxica. Los componentes del kit que contienen azida sódica han sido clasificados, según las directivas de la Comunidad Europea (CEE) del siguiente modo: **Xn (Tóxico)** y deben ser desechados en la piletta de lavado con agua corriente para evitar que los componentes tóxicos se acumulen en la cañería.
- Evite el contacto de cualquiera de los componentes del kit con la piel o con membranas mucosas. En caso de accidente, enjuague el área afectada inmediatamente con agua y consulte con un médico. No pipetear ninguna solución con la boca.
- La solución de paro contiene solución cáustica (NaOH-3N).. Úsela con precaución y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite su exposición a ácidos, metales y/o cualquier otro compuesto que pueda reaccionar con bases. Las salpicaduras deberán ser limpiadas inmediatamente.

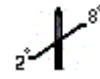


- R20 Tóxico por inhalación
- R21 Tóxico por contacto con la piel
- R22 Tóxico por contacto con la boca y/o mucosas
- R32 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos
- S2 Manténgase fuera del alcance de los niños
- S13 Manténgase alejado de comidas, bebidas y alimento para animales
- S36 Usar indumentaria protectora.
- S37 Usar guantes desechables.
- S46 En caso de ingestión, consultar inmediatamente al médico y mostrarle el envase o la etiqueta.
- R36: Irritante a los ojos.
- R38: Irritante a la piel.

4.3 Equipamiento necesario para el ensayo pero no provisto en el Kit

- Micropipeta / Pipeta Multicanal calibrada para dispensar 5-1000 µl.
- Probeta de 1 litro.
- Tubos de ensayo y gradillas.
- Agua Destilada.
- Lector de placas ELISA con filtro de 405 nm.
- Lavador de placas ELISA automático o semiautomático (opcional).
- Mezclador/agitador magnético.
- Mezclador tipo Vortex.

4.4 Almacenado y Conservación del kit



Se recomienda que el *APL ELISA™ IgM Kit* sea almacenado a temperaturas de 2-8 °C hasta su fecha de expiración, esté el kit cerrado o con los componentes sobrantes después de abierto.

- No congele ninguno de los componentes del *APL ELISA™ IgM Kit*.
- No mezcle reactivos de lotes distintos.
- No sustituya los componentes por otros reactivos.
- No use los reactivos después de la fecha de caducidad.

5 – RECOLECCIÓN Y ALMACENAJE DE LAS MUESTRAS.

Las pruebas pueden realizarse usando suero o plasma humanos. Se recomienda no usar muestras que han sido inactivadas por calor a 56°C durante 30 minutos o más. Muestras que estén hemolizadas, lipémicas o muy contaminadas deberán ser también descartadas. Las muestras de pacientes que no van a ser analizadas en las siguientes 24 horas, deberán ser guardadas en un congelador a -20°C o menos.

6 – INSTRUCCIONES PARA LA UTILIZACIÓN DEL KIT

6.1 Comentarios preliminares, precauciones y advertencias (11-16)

Notas del procedimiento

- Leer las instrucciones del Manual de Instrucciones en su totalidad antes de iniciar las pruebas.
- Dejar que todos los reactivos, las placas y las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de utilizarlos.
- Guardar en la nevera tan pronto como sea posible todos los reactivos, muestras y componentes que no se usen o que se hayan terminado de usar.
- El *APL ELISA™ IgM Calibrador* sólo se debe usar en el *APL ELISA™ IgM Kit ELISA Kit*.
- Monitorear cuidadosamente los tiempos de incubación.
- Comenzar a contar el tiempo de incubación inmediatamente después de agregar el último reactivo.
- Utilizar puntas desechables limpias para cada muestra y cada reactivo.
- No utilizar Tween u otros detergentes y asegurarse que los instrumentos de vidrio y/o plástico no contengan trazas de éste u otros detergentes.
- El sustrato y la solución de paro deben ser manipulados con precaución. Evitar el contacto con las mucosas y la piel.
- Estimar el volumen necesario de cada reactivo antes de comenzar con la prueba. Hacer un cálculo del volumen de acuerdo con la cantidad de muestras a analizar.

6.2 Procedimiento detallado de la prueba

- a. Solución Salina Fosfatada o tampón fosfato (PBS).
- Remover el contenido de la botella rotulada *APL ELISA™ AP PBS Concentrado* y verterlo en una probeta de 1 litro.
 - Agregar agua destilada hasta completar 1 litro.
 - Agitar con agitador magnético hasta que el *APL ELISA™ AP PBS Concentrado* se haya disuelto completamente
 - Verter la cantidad de PBS requerido para la tanda en un recipiente y mantenerlo a temperatura ambiente, listo para ser usado.
 - Almacenar el exceso de PBS en una botella o recipiente cerrado en el

refrigerador.

- b. Placas
- Sacar las placas de la bolsa por lo menos 10 minutos antes de usar.
 - Si la placa no va a ser usada en su totalidad, sacar las tiras que no se usarán y colocarlas de vuelta en la bolsa metálica y almacenarlas en el refrigerador.
 - **Terminada la prueba, sacar del marco las tiras usadas y desecharlas.**
 - limpiar y secar el marco, colocar las tiras previamente guardadas en la nevera dentro del marco, colocar el marco con las tiras sin usar dentro de la bolsa metálica y almacenarlas en el refrigerador.
- c. Dilución del Calibrador, los Controles, y las Muestras
- Colocar tubos de prueba en una gradilla
 - Marcar los primeros 5 tubos de C1 a C5 (calibradores), marcar el sexto tubo P (control positivo), el séptimo tubo N (control negativo), y un octavo tubo B (blanco de muestra) para completar la primera columna de 8 tubos.
 - Marcar los tubos restantes con la identificación de cada muestra a ser testada. (U###)
 - **Una curva de calibración debe ser construida para cada corrida.**
 - Para los calibradores de la curva de calibración (C1 a C5):
 - Pipetear 490 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra* en el tubo marcado C1.
 - Pipetear 250 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra* en los tubos marcados C2 a C5.
 - Diluir 10 µl del *APL ELISA™ IgM Calibrador* (dilución 1/50) en el tubo C1. Mezclar con Vortex evitando la formación excesiva de burbujas.
 - Transferir 250 µl del tubo C1 al tubo C2. Mezclar con Vortex evitando la formación de burbujas. Continuar con la dilución seriada al medio con el resto de los tubos (C3 a C5)
 - Para el Control Positivo, el Control Negativo y las Muestras desconocidas hacer una dilución 1:50.
 - Diluir 10 µl del *APL ELISA™ IgM Control Positivo* en 490 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra*. (tubo P).
 - Diluir 10 µl del *APL ELISA™ Control Negativo* en 490 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra*. (tubo N)
 - Diluir, para cada muestra, 10 µl de muestra en 490 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra*. (tubo U##)
 - Mezclar con Vortex todas y cada una de las diluciones.

- d. Adición de los calibradores, las muestras y los controles a las placas
- **Todas las muestras, calibradores y controles deben ser testados por duplicado.**
 - Agregar 50 µl de *APL ELISA™ Diluyente de Muestra* en los pocillos del blanco por duplicado. (B)
 - Agregar 50 µl de cada tubo de la dilución seriada al medio del *APL ELISA™ IgM calibrador* (C1 a C5) en los pocillos correspondientes por duplicado.
 - Agregar 50 µl de la dilución del *APL ELISA™ IgM Control Positivo* en los pocillos correspondientes por duplicado. (P)
 - Agregar 50 µl de la dilución del *APL ELISA™ Control Negativo* en los pocillos correspondientes por duplicado. (N)
 - Agregar 50 µl de cada dilución de las muestras de pacientes en los pocillos correspondientes por duplicado. (U##)
 - Después de completar el llenado de la placa, dar dos golpecitos en el costado del marco de cada lado de la placa para asegurar una distribución similar de los reactivos.
 - Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- e. Lavado de las placas
- Después del período de incubación, lavar las placas 3 veces con la solución de lavado *APL ELISA™ AP PBS*.
 - Esta operación puede ser realizada con un lavador automático o semi-automático de placas de ELISA o usando una pipeta multicanal.
 - Agregar 100 µl de la solución de lavado *APL ELISA™ AP PBS* en cada pocillo por cada lavado.
 - Luego de cada adición de solución de lavado, dar dos golpecitos en el costado del marco y vaciar el contenido de la placa. Asegurar que las tiras en la placa estén firmemente sujetas al marco.
 - Al final del tercer lavado, poner la placa boca abajo y golpearla suavemente sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente.

- f. Adición del *APL ELISA™ IgM AP Conjugado*
- Sacar cuidadosamente la cantidad estimada necesaria de la solución de la botella del *APL ELISA™ IgM AP Conjugado* y verterla en un recipiente para pipeteado previamente rotulado.
 - Agregar 50µl del *APL ELISA™ IgM AP Conjugado* en grupos de 8 ó 12 utilizando una pipeta multicanal a las columnas consecutivas de la placa hasta llenar toda la placa.
 - Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- g. Adición del sustrato *APL ELISA™ AP Sustrato*

- Precalentar la cantidad necesaria estimada de solución sustrato a 37°C durante 10- 15 minutos. Esto logra acelerar la reacción de color.
- Después del período de incubación de 30 minutos con el *APL ELISA™ IgM AP Conjugado*, lavar las placas 3 veces con la solución de lavado *APL ELISA™ AP PBS* como se describe en el párrafo ‘e’ de esta misma sección.
- Agregar 50µl del *APL ELISA™ AP Sustrato* en grupos de 8 ó 12 utilizando una pipeta multicanal a las columnas consecutivas de la placa hasta llenar toda la placa.
- Colocar la placa en una caja de cartón oscura o en un contenedor oscuro y colocarlo en un incubador a 37°C para acelerar la reacción de color.
- Controlar las lecturas de D. O. de las placas en un espectrofotómetro hasta que el calibrador C1 alcance una lectura de D.O. de 1,1 – 1,2 (a 405 nm). Este proceso toma aproximadamente de 15 a 30 minutos si la incubación con el sustrato se hace a 37°C, o hasta 45-50 minutos si el desarrollo del color se hace a temperatura ambiente.

- h. Detención de la reacción del color y lectura
- Detener la reacción del color agregando 100 µl de *APL ELISA™ AP Solución de Paro* en grupos de 8 ó 12 utilizando una pipeta multicanal a las columnas consecutivas de la placa hasta llenar toda la placa.
 - **Leer la placa una vez más a 405 nm.**
 - Utilizar los datos obtenidos para establecer una curva de calibración.

7 – RESULTADOS

7.1 Elaboración de la curva de calibración

- Una nueva curva de calibración debe ser construida cada vez. (11-16)
- Determinar la densidad óptica (D.O.) media de los duplicados de los calibradores (C1-C5), del control positivo (P) y negativo (N), y del blanco (B).
- Sustraer el valor D.O. medio del blanco (B) de todas las lecturas medias restantes.
- Graficar las D.O. medias de los 5 calibradores y construir una curva de densidad óptica (D.O.) en función del valor de la concentración de cada calibrador. Los tipos de curva más adaptables para este método es el tipo log-log (Figura 1) o log-logit (Figura 2).
- Se recomienda usar un ordenador con el apropiado software validado para obtener mejores resultados.
- El **valor inicial de concentración del calibrador** se encuentra anotado en el rótulo del calibrador.

Figura 1. Ejemplo de una curva de calibración para anticuerpos IgM aCL usando una gráfica tipo log-log.

Using Standard Data Set from Current Experiment.
 Log-log Fit: $\text{Log}(Y) = \text{slope} \cdot \text{Log}(X) + \text{intercept}$
 20/50/80%: X = 31.100 / 65.256 / 98.279 Y = 0.267 / 0.588 / 0.908
 intercept: -2.158 (+/-0.028), slope: 1.062 (+/-0.013)
 chi2=0.012, RMS=0.039, r^2=0.999

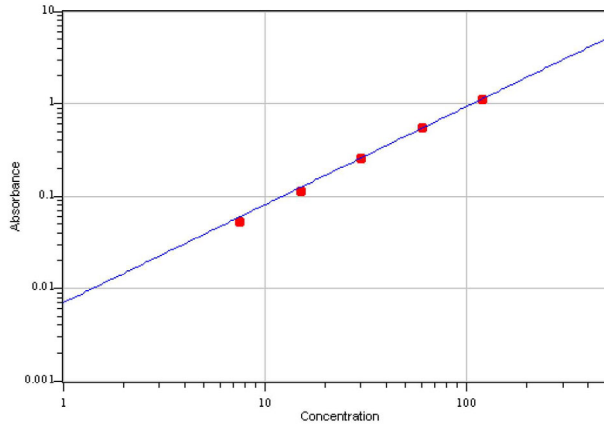
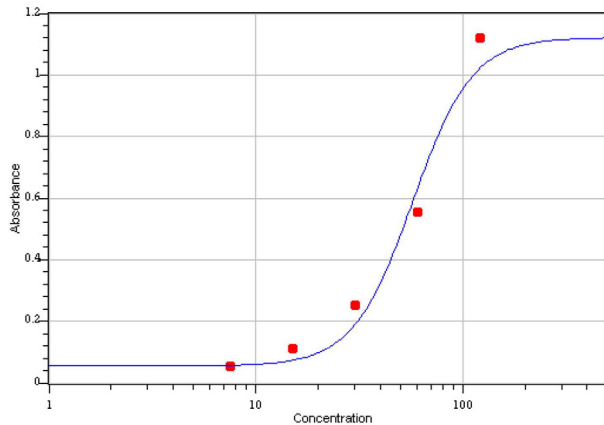


Figura 2. Ejemplo de una curva de calibración para anticuerpos IgM aCL usando una gráfica tipo log-logit.

Using Standard Data Set from Current Experiment.
 Logit-log Fit: $Y = (A-D) / (1 + (X/C)^B) + D$
 20/50/80%: X = 36.206 / 57.246 / 90.513 Y = 0.267 / 0.588 / 0.908
 A: 0.054, B: 3.026 (+/-0.497), C: 57.246 (+/-3.247), D: 1.122
 chi2=0.044, RMS=0.074, r^2=0.978



7.2 Ejemplo de una curva de calibración.

Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos de una tanda típica, se pueden encontrar en la Tabla 1

- No utilizar estos valores para construir una curva de calibración.
- **Este es solamente un ejemplo.**
- **Para calibrar la curva se deberán utilizar los valores O.D. obtenidos durante el ensayo.**

Tabla 1. Valores Típicos de una Curva Calibración.

Calibrador	Curva Típica IgM APL	
	D. O.	MPL
<i>APL ELISA™ IgM Calibrador (C1)</i>	1.084	120
<i>APL ELISA™ IgM Calibrador (C2)</i>	0.650	60
<i>APL ELISA™ IgM Calibrador (C3)</i>	0.357	30
<i>APL ELISA™ IgM Calibrador (C4)</i>	0.152	15
<i>APL ELISA™ IgM Calibrador (C5)</i>	0.048	7.5
<i>APL ELISA™ IgM Control Positivo</i>	0.470	En rango
<i>APL ELISA™ Control Negativo</i>	0.034	<10

MPL: 1 unidad MPL es la actividad anticardiolipina de 1 µg/ml de anticuerpo IgM purificado por afinidad.

7.3 Resultados esperados

- El rango en el cual debe caer el *APL ELISA™ IgM Control Positivo* se muestra en el rótulo del tubo.
- En caso de que el *APL ELISA™ IgM Control Positivo* cayera fuera del rango indicado en el rótulo, el operador deberá revisar los cálculos y procedimientos para ver si se cometió un error. Si no se encuentra un error, el ensayo deberá ser repetido.
- El *APL ELISA™ Control Negativo* deberá dar valores menores que el punto de corte del ensayo sugerido de 10 unidades MPL.
- Valores menores que 25 MPL y mayores que el punto de corte son considerados “indeterminados (Zona Gris)”. Las muestras que caen en esta categoría deberían ser re-testeadas en fecha posterior para confirmar la positividad. (9, 17)
- Si la muestra de un paciente presenta valores de D.O. mayores que la del Calibrador 1, la muestra deberá ser diluida en serie y analizada nuevamente. Los valores obtenidos en unidades MPL deberán ser luego multiplicados por el factor de dilución apropiado.

8 – CONTROL DE CALIDAD

- El *APL ELISA™ IgM Control Positivo* y el *APL ELISA™ Control Negativo* han sido provistos para asegurar el funcionamiento correcto del ensayo
- El *APL ELISA™ IgM Control Positivo* posee un rango definido de nivel IgM anticardiolipina expresado en unidades MPL. Este rango está indicado en el rótulo del vial.
- El ensayo se considera que está funcionando correctamente cuando el nivel IgM anticardiolipina del *APL ELISA™ IgM Control Positivo* cae dentro del rango definido.
- El *APL ELISA™ Control Negativo* deberá dar valores menores que el punto de corte del ensayo sugerido de 10 unidades MPL
- El valor D.O. medio neto del calibrador más alto debe ser $\geq 1,0$
- El valor medio de la D.O. del blanco debe ser menor que 0,2.

9 – LIMITACIONES

- El diagnóstico del Síndrome Antifosfolípido (SAF) no debe realizarse solamente sobre la base de un resultado positivo de la prueba de anticuerpos anticardiolipina.
- Los criterios para efectuar el diagnóstico de SAF deben incluir por lo menos una de las siguientes manifestaciones clínicas: trombosis, pérdida fetal y/o trombocitopenia, combinada con un test de anticuerpos anticardiolipina por ELISA positivo y/o un resultado positivo en la prueba del anticoagulante lúpico.
- Ciertos pacientes pueden ser positivos para la prueba del anticoagulante lúpico y dar un resultado negativo en pruebas de anticardiolipina por ELISA, por lo tanto, se recomienda realizar ambas pruebas en pacientes en los que se sospecha el SAF.
- Adicionalmente, en una variedad de estados infecciosos, incluyendo pacientes positivos de SIDA, otras enfermedades infecciosas, y algunas enfermedades inducidas por drogas, puede ser probable que se obtengan algunos resultados falsos positivos.

10 – CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

10.1 Especificidad

Muestras Normales

Muestras de 200 donantes normales se analizaron en el *APL ELISA™ IgM Kit*. Se determinó un punto de corte de 10 unidades MPL basado en el 95° percentilo debido a que los valores no siguieron una distribución normal.

Muestras con Enfermedades

Muestras de IgM positivas de pacientes con diferentes enfermedades fueron probadas en el *APL ELISA™ IgM Kit*. Los resultados obtenidos se listan en la siguiente tabla:

Tipo de enfermedad	Cantidad de muestras analizadas	Cantidad de muestras positivas *
SAF and LES	20	20
Sífilis +	20	0
Factor Reumatoideo	9	0
Otras enfermedades autoinmunes	24	6

* Positivo se define como mayor que 10 unidades MPL para *IgM aCL*

10.2 Sensibilidad

- Muestras de sueros de 20 pacientes definidos con SAF se analizaron con el *APL ELISA™ IgM Kit*.
- 20 pacientes resultaron positivos para anticuerpos anticardiolipina IgM

10.3 Precisión

Variaciones Intra-ensayo

Variaciones Intra-ensayo fueron determinadas procesando 3 muestras para anticuerpos *IgM aCL* con el *APL ELISA™ IgM Kit* 12 veces en la misma placa. Los valores estadísticos se calcularon y se muestran en la siguiente tabla

Muestra	Media	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
A	98.6	8.0	10.3
B	78.9	7.8	9.3
C	10.3	1.2	8.9

10.4 Reproducibilidad

Variaciones Inter-ensayo

Variaciones Inter-ensayo fueron determinadas procesando 3 muestras (alto, mediano y bajo) para anticuerpos *IgM* con el *APL ELISA™ IgM Kit*, 17 veces en distintas placas.

Los valores estadísticos se calcularon y se muestran en la siguiente tabla

Muestra	Media	Desviación Estándar	% Coeficiente de Variación
A	123.0	20.3	9.3
B	25.4	1.4	5.3
C	10.6	1.3	9.8

10.5 Recuperación

- El *APL ELISA™ IgM Calibrador* fue diluido con suero normal como se indica en la siguiente tabla y las distintas diluciones (muestras) fueron probadas en el *APL ELISA™ IgM Kit*.
- Los valores esperados, en unidades MPL fueron calculados dividiendo la concentración del *APL ELISA™ IgM Calibrador* por el factor de dilución.
- Los valores observados, en unidades MPL, fueron derivados de la curva de calibración.

Dilución del Calibrador	MPL Observado	MPL Esperado	% de Recuperación
Puro	119.0	120.0	99
1:2	65.0	60.0	108
1:4	32.0	30.0	107
1:8	16.0	15.0	107
1:16	7.5	7.5	100
1:32	3.9	3.75	104

11 – BIBLIOGRAFIA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306
2. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, et al. Anti-cardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis. *Lancet.* 1983; ii: 1211-1214
3. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br. J. Rheumatol.* 1987; 26: 324-36
4. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, Chan JKH, Englert H, et al. Affinity-purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. *J. Lab Clin. Immunol.* 1985; 17: 155-162
5. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood.* 1987; 70: 69-76
6. Derksen RHWM, Beisma D, Bouma BN. Discordant effects of prednisone on anti-cardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Arthr. Rheum.* 1986; 29: 1295-6
7. Triplett DA, Brandt JT. Lupus anticoagulants: misnomer, paradox, riddle, epiphenomenon. *Hematologic Pathol.* 1988; 2: 121-143
8. Lockshin MD, Qamar T, Druzin ML, Goei S. Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant, and fetal death. *J. Rheumatol.* 1987; 14: 259-262
9. Pierangeli SS, Harris EN. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA. *Nat Protoc.* 2008; 3: 840-8
10. Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol.* 1990; 74: 1-9
11. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held April 4 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987; 68: 215-22
12. Harris EN. Special report. The second international anti-cardiolipin standardization workshop / the Kingston Anti-phospholipid Antibody Study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol.* 1990; 94: 476-84
13. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol.* 1998; 25: 156-60
14. Harris EN, Pierangeli SS. 'Equivocal' antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2000; 15: 81-5
15. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol.* 2001; 44: 48-57
16. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus.* 2002; 11: 269-75
17. Budd R, Harley E, Quarshie A, Henderson V, Harris EN, et al. A re-appraisal of the normal cut-off assignment for anticardiolipin IgM tests. *J Thromb Haemostasis.* 2006; 4: 2210-2214

Louisville APL Diagnostics, Inc.

Revisión #4 – Marzo 15, 2020

REF	LAPL-K-AP-M
-----	-------------