



A_{Ph}L ELISA® IgG e IgM HRP Kit

REF	LAPL-K-HRP-00GM
------------	------------------------

Para la medición de Anticuerpos Antifosfolípidos IgG e IgM

IVD

Para uso diagnóstico *In Vitro*



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

AphL ELISA® IgG e IgM HRP 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>AphL ELISA® IgG e IgM HRP 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.....	8
6.1 Comentarios preliminares, precauciones y advertencias	8
6.2 Procedimiento detallado de la prueba	9
a. Solución Salina Fosfatada o tampón fosfato (PBS)	9
b. Placas	9
c. Dilución de las Muestras y de los Controles.....	10
d. Adición de las muestras y controles a las placas de ELISA	10
e. Lavado de las placas	10
f. Adición del <i>Conjugado (IgG o IgM)</i>	11
g. Adición del sustrato	11
h. Detención de la reacción del color	11
7 – Resultados	11
7.1 Elaboración de la curva de calibración	11
7.2 Ejemplo de una curva de calibración	12
7.3 Resultados esperados	13
8 – Control de calidad	14
9 – Limitaciones.....	14
10 – Características del ensayo	15
10.1 Especificidad.....	15
10.2 Sensibilidad.....	16
10.3 Precisión	16
10.4 Reproducibilidad.....	17
10.5 Recuperación	18
11 – Bibliografía	19

1 – USO AL QUE ESTA DESTINADO

El *AphL ELISA® IgG e IgM HRP 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 IgG e 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.

Uno de los mayores inconvenientes de la prueba de ELISA para anticuerpos anticardiolipina es la cantidad de reacciones “falsas positivas” que se obtienen. Es común observar la unión “no-específica” de sueros de pacientes con una variedad de enfermedades, que no son el síndrome antifosfolípido (9-12). A través de estudios usando fosfolípidos individuales y mezclas de distintos fosfolípidos, se estableció que una combinación de fosfatidilserina, ácido fosfatídico, y β_2 Glicoproteína I es la que mejor permite diferenciar los sueros con síndrome antifosfolípido de sueros de pacientes con otras enfermedades, en particular sífilis. Este antígeno ha sido llamado el *AphL ELISA® Mezcla Fosfolípida* y se usa para preparar las placas en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*. Con la única excepción del uso de este antígeno, el principio del *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit* es el mismo que el de ELISA para anticuerpos anticardiolipina (13-14).

El *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit* está calibrado en unidades estándar GPL y MPL (15-20) y puede ser usado para detectar anticuerpos del tipo IgG y/o IgM. En adición a los seis calibradores prediluidos *AphL ELISA® HRP IgG Calibradores* tipo IgG y seis calibradores prediluidos *AphL ELISA® HRP IgM Calibradores* tipo IgM, se han incluido un control positivo *AphL ELISA® HRP IgG Control Positivo* tipo IgG con un rango y valor definidos, un control positivo

AphL ELISA® HRP IgM Control Positivo tipo IgM con un rango y valor definidos y un control negativo *AphL ELISA® HRP Control Negativo* como control interno del ensayo que permiten determinar cuando una prueba en particular es aceptable o no.

3 – PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este ensayo se utiliza una técnica estándar de ELISA. Los calibradores prediluidos, controles y sueros p plasmas de los pacientes se incuban en pocillos de placas de poliestireno que han sido cubiertos con el antígeno antifosfolípido “*AphL ELISA® Mezcla Fosfolípida*”. Este proceso permite que los anticuerpos antifosfolípidos de tipo IgG y/o IgM en el suero o plasma de los pacientes reaccionen con el antígeno en las placas. El lavado elimina las proteínas no unidas. Se agregan entonces anticuerpos anti-IgG y/o IgM marcados con conjugado de peroxidasa *AphL ELISA® HRP IgG Conjugado* y/o *AphL ELISA® HRP IgM Conjugado*. Después de un lavado adicional, se logra la reacción de color mediante la adición del sustrato cromogénico de peroxidasa específico *AphL ELISA® TMB Sustrato*.

4 – COMPONENTES

4.1 Contenido del *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*

Inspeccionar el contenido del *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit* de acuerdo con la siguiente lista:

24 - tiras de poliestireno preparadas con el *AphL ELISA® Antígeno Fosfolípido* de 1 x 8 pocillos (2 placas x 12 tiras)



- 2 - 55 ml botellas de *AphL ELISA® Diluyente de Muestra* listo para usar. *
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #1* (200 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #2* (100 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #3* (50 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #4* (25 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #5* (12.5 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador #6* (6.25 GPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #1* (200 MPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #2* (100 MPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #3* (50 MPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #4* (25 MPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #5* (12.5 MPL) listo para usar.
- 1 - 1.0 ml vial *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador #6* (6.25 MPL) listo para usar.
- 1 - 15 ml botella de *AphL ELISA® HRP IgG Conjugado* listo para usar.
- 1 - 15 ml botella de *AphL ELISA® HRP IgM Conjugado* listo para usar.



2 - 15 ml botella de *AphL ELISA® TMB Sustrato* listo para usar.



2 - 15 ml botella de *AphL ELISA® HRP Solución de Paro* listo para usar.

1 - 15 ml botella de *AphL ELISA® HRP PBS Concentrado* para ser preparado en 1000 ml de dH2O.



1 - 200 µl vial *AphL ELISA® HRP Control Negativo* para ser diluido en diluyente de muestra. *



1 - 200 µl vial *AphL ELISA® HRP IgG Control Positivo* para ser diluido en diluyente de muestra. *

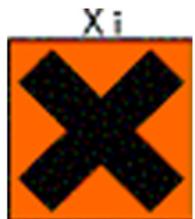
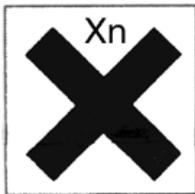


1 - 200 µl vial *AphL ELISA® HRP IgM Control Positivo* para ser diluido en diluyente de muestra. *

* Contiene 0.2% 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 *APhL ELISA® IgG e IgM HRP Kit* han sido testados y han dado resultados negativos 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 ácido diluido. Úsela con precaución y evite el contacto con la piel y los ojos. Evite su exposición a soluciones básicas, metales y/o cualquier otro compuesto que pueda reaccionar con ácidos. 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 450 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 *APhL ELISA® IgG e IgM HRP 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 *APhL ELISA® IgG e IgM HRP 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.

Seguido a la colección de la muestra, se debe separar el suero o plasma de la sangre entera lo más pronto posible. Una vez separada la muestra puede mantenerse a temperatura ambiente por hasta 48 horas, o ser refrigerada a 2-8°C por 14 días, o guardadas en un congelador a -20°C o menos por hasta 365 días.

6 – INSTRUCCIONES PARA LA UTILIZACIÓN DEL KIT

6.1 Comentarios preliminares, precauciones y advertencias

Notas del procedimiento

- Leer las instrucciones del Manual de Instrucciones en su totalidad antes de iniciar las pruebas.
- Dejar que todos los reactivos, 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.
- Los *AphL ELISA® HRP IgG Calibradores* y los *AphL ELISA® HRP IgM Calibradores* sólo se deben usar en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP 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 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

- Solución Salina Fosfatada o tampón fosfato (PBS).
 - Remover el contenido de la botella rotulada *AphL ELISA® HRP PBS Concentrado* y verterlo en una probeta de 1 litro.
 - Agregar agua destilada hasta completar 1 litro.
 - Agitar con agitador magnético hasta que el *AphL ELISA® HRP 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.
- 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.

- Dilución de las Muestras y de los Controles
 - Los calibradores (6) están listos para usar y no necesitan diluirse.
 - Para el Control Positivo, el Control Negativo y las Muestras desconocidas hacer una dilución 1/50.
 - Diluir 10 µl del *AphL ELISA® HRP IgG Control Positivo* o 10 µl del *AphL ELISA® HRP IgM Control Positivo* en 490 µl de *AphL ELISA® Diluyente de Muestra*.
 - Diluir 10 µl del *AphL ELISA® HRP Control Negativo* en 490 µl de *AphL ELISA® Diluyente de Muestra*.
 - Diluir, para cada muestra, 10 µl de muestra en 490 µl de *AphL ELISA® Diluyente de Muestra*.
 - Mezclar con Vortex todas y cada una de las diluciones.
- Adición de las muestras y controles a las placas de ELISA
 - Agregar 100 µl de *AphL ELISA® Diluyente de Muestra* en los pocillos del blanco por duplicado.
 - Agregar 100 µl de *cada AphL ELISA® HRP IgG calibrador* o 100 µl de *cada AphL ELISA® HRP IgM calibrador* en los pocillos correspondientes por duplicado.
 - Agregar 100 µl de la dilución del *AphL ELISA® HRP IgG Control Positivo* o 100 µl de la dilución del *AphL ELISA® HRP IgM Control Positivo* en los pocillos correspondientes por duplicado.
 - Agregar 100 µl de la dilución del *AphL ELISA® HRP Control Negativo* en los pocillos correspondientes por duplicado.
 - Agregar 100 µl de cada dilución de las muestras de pacientes en los pocillos correspondientes por duplicado.
 - 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.
- Lavado de las placas
 - Después del período de incubación, lavar las placas 3 veces con la solución de lavado *AphL ELISA® HRP PBS*.
 - Esta operación puede ser realizada con un lavador automático o semi-automático de placas de ELISA o usando una pipeta multicanal.
 - Agregar 200 µl de la solución de lavado *AphL ELISA® HRP 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 *AphL ELISA® HRP Conjugado (IgG o IgM)*

- Sacar cuidadosamente la cantidad necesaria estimada de solución de la botella de 15 ml del *AphL ELISA® HRP IgG Conjugado* o del *AphL ELISA® HRP IgM Conjugado* y colocarla en un recipiente para pipeteado.
- Agregar 100µl del *AphL ELISA® HRP IgG Conjugado* o del *AphL ELISA® HRP IgM 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 *AphL ELISA® TMB Sustrato*

- Después del período de incubación, lavar las placas 3 veces con la solución de lavado *AphL ELISA® HRP PBS* como se describe en el párrafo ‘e’ de esta misma sección.
- Agregar 100µl del *AphL ELISA® HRP Sustrato* 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.

h. Detención de la reacción del color

- Detener la reacción del color agregando 100 µl de *AphL ELISA® HRP 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 en el lector de microplacas de ELISA a 450 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 que se lea una placa para cada isotipo (IgG o IgM).
- Determinar la densidad óptica (D.O.) media de los duplicados de los calibradores (C1-C6), del control positivo (S) 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 6 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 de concentración de cada calibrador se encuentra anotado en el rótulo de cada calibrador.

Figura 1. Ejemplo de una curva de calibración para (a) anticuerpos IgG aPL y (b) anticuerpos IgM aPL usando una gráfica tipo log-log.

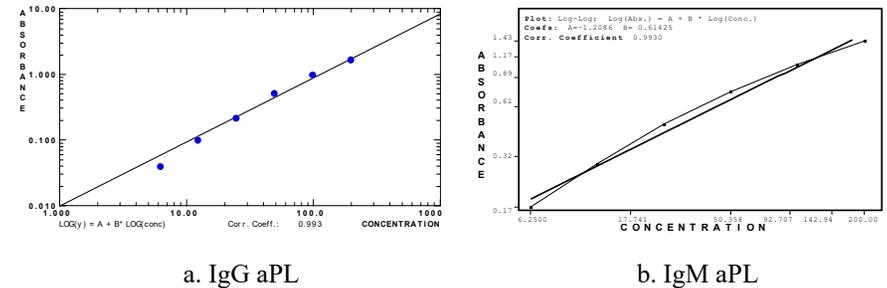
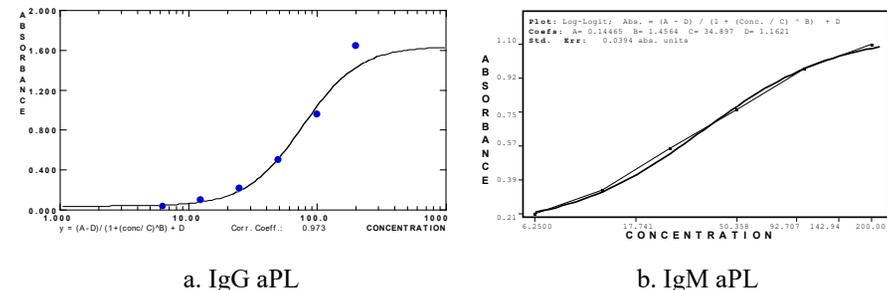


Figura 2. Ejemplo de una curva de calibración para (a) anticuerpos IgG aPL y (b) anticuerpos IgM aPL usando una gráfica tipo log-logit.



7.2 Ejemplo de una curva de calibración.

Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos de una tanda típica, se pueden encontrar para IgG en la Tabla 1 y para IgM en la Tabla 2

- 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 del tipo IgG.

Calibrador	Curva típica IgG APhL ELISA®	
	D.O.	GPL
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 1</i>	1,802	200
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 2</i>	1,058	100
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 3</i>	0,676	50
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 4</i>	0,314	25
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 5</i>	0,147	12,5
<i>APhL ELISA® HRP IgG Calibrador 6</i>	0,035	6,25

GPL: 1 unidad GPL es la actividad antifosfolípida de 1 µg/ml de anticuerpo IgG purificado por afinidad.

Tabla 2. Valores Típicos de una Curva Calibración del tipo IgM.

Calibrador	Curva típica IgM APhL ELISA®	
	D.O.	MPL
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 1</i>	1,608	200
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 2</i>	1,070	100
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 3</i>	0,841	50
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 4</i>	0,481	25
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 5</i>	0,294	12,5
<i>APhL ELISA® HRP IgM Calibrador 6</i>	0,154	6,25

7.3 Resultados esperados

- El rango en el cual debe caer el *APhL ELISA® HRP IgG Control Positivo* y el *APhL ELISA® HRP IgM Control Positivo* se muestra en el rótulo del tubo.
- En caso de que el *APhL ELISA® HRP IgG Control Positivo* y/o el *APhL ELISA® HRP IgM Control Positivo* cayeran 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 *APhL ELISA® HRP Control Negativo* deberá dar valores menores que el punto de corte del ensayo sugerido de 15 unidades GPL o 15 unidades MPL.
- Valores menores que 27 GPL y 38 MPL y mayores que el punto de corte para IgG e IgM respectivamente son considerados “indeterminados (Zona Gris)”. Las muestras que caen en esta categoría deberían ser re-testeadas en fecha posterior para confirmar la positividad. (21)
- Si la muestra de un paciente presenta valores de D.O. mayores que la del Calibrador 1, la muestra podrá ser diluida en serie y analizada nuevamente y

los valores obtenidos en unidades GPL o unidades MPL, deberán ser luego multiplicados por el factor de dilución apropiado, o reportada como >200 GPL o MPL.

8 – CONTROL DE CALIDAD

- El *APhL ELISA® HRP IgG Control Positivo*, el *APhL ELISA® HRP IgM Control Positivo* y el *APhL ELISA® HRP IgG Control Negativo* han sido provistos para asegurar el funcionamiento correcto del ensayo
- El *APhL ELISA® HRP IgG Control Positivo* posee un rango definido de nivel IgG antifosfolípido. Este rango se indica en el rótulo del vial.
- El *APhL ELISA® HRP IgM Control Positivo* posee un rango definido de nivel IgM antifosfolípido. Este rango se indica en el rótulo del vial.
- El ensayo se considera que esta funcionando correctamente cuando el nivel IgG antifosfolípido del *APhL ELISA® HRP IgG Control Positivo* y/o el nivel IgM antifosfolípido del *APhL ELISA® HRP IgM Control Positivo* caen dentro del rango definido.
- El *APhL ELISA® HRP Control Negativo* deberá dar valores menores que el punto de corte del ensayo sugerido de 15 unidades GPL.
- El valor D.O. medio neto del calibrador más alto debe ser $\geq 1,0$
- El valor D.O. medio 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 antifosfolípidos. 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 antifosfolípidos 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 antifosfolípidos por ELISA, por lo tanto, se recomienda realizar ambas pruebas en pacientes en los que se sospecha el SAF.
- A pesar de que el *APhL ELISA® IgG e IgM HRP Kit* reduce considerablemente la frecuencia de resultados falsos positivos de muestras de pacientes con sífilis, es todavía posible que algunas muestras puedan dar resultados positivos. Más aun, 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 50 donantes normales se analizaron en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*. Un valor de corte de 15 unidades GPL y de 15 unidades MPL fue determinado basado en un percentil del 99%.

Muestras con Enfermedades

Muestras positivas de diferentes enfermedades fueron probadas en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*. Los resultados obtenidos se listan en las siguientes tablas: Tabla 3 para IgG y Tabla 4 para IgM

Tabla 3: Muestras Positivas para IgG de distintas enfermedades

Tipo de enfermedad	Cantidad de muestras analizadas.	Cantidad de muestras positivas *
APS	43	43
Sífilis +	16	1
Otras enfermedades autoinmunes	16	1

* Positivo se define como mayor que 15 unidades GPL de IgG aPL

Tabla 4: Muestras Positivas para IgM de distintas enfermedades

Tipo de enfermedad	Cantidad de muestras analizadas.	Cantidad de muestras positivas *
APS	39	39
Sífilis +	16	1
Otras enfermedades autoinmunes	16	1

* Positivo se define como mayor que 15 unidades MPL de IgM aPL

10.2 Sensibilidad

- Muestras de sueros de 43 pacientes con SAF se analizaron con el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*.
- Los 43 pacientes resultaron positivos para anticuerpos antifosfolípidos IgG.
- Muestras de sueros de 39 pacientes con SAF se analizaron con el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*.
- Los 39 pacientes resultaron positivos para anticuerpos antifosfolípidos IgM.

10.3 Precisión

Variaciones Intra-ensayo

Variaciones Intra-ensayo fueron determinadas procesando 3 muestras para anticuerpos IgG aPL y 3 muestras para anticuerpos IgM aPL con el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*, 10 veces en la misma placa.

Los valores estadísticos se calcularon y se muestran en las siguientes tablas: Tabla 5 para IgG y Tabla 6 para IgM

Tabla 5: Muestras IgG

Muestra	Media	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
A	181.6	12.8	7.0
B	44.9	3.8	8.5
C	30.8	2.5	8.0

Tabla 6: Muestras IgM

Muestra	Media	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
A	181,6	12,8	7,0
B	43,9	4,5	8,5
C	30,8	3,6	8,0

10.4 Reproducibilidad

Variaciones Inter-ensayo

Variaciones Inter-ensayo fueron determinadas procesando 3 muestras (alto, mediano y bajo) para anticuerpos IgG aPL y 3 muestras (alto, mediano y bajo) para anticuerpos IgM aPL con el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*, 10 veces en distintas placas.

Los valores estadísticos se calcularon y se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 7 para IgG y Tabla 8 para IgM

Tabla 7: Muestras IgG

Muestra	Media	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
A	86.5	8.5	9.8
B	21.5	2.5	11.6
C	11.2	1.4	12.5

Tabla 8: Muestras IgM

Muestra	Media	Desviación estándar	% Coeficiente de Variación
A	178.5	6.5	3.6
B	45.6	4.4	9.6
C	21.2	2.0	9.3

10.5 Recuperación

- El *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador 1* fue diluido con suero normal como se indica en la siguiente tabla y las distintas diluciones (muestras) fueron probadas en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*.
- Los valores esperados, en unidades GPL, fueron calculados dividiendo la concentración del *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador 1* por el factor de dilución.
- Los valores observados, en unidades GPL, fueron derivados de la curva de calibración.

Tabla 9: Recuperación del *AphL ELISA® HRP IgG Calibrador 1*

Dilución del Calibrador	GPL Observado	GPL Esperado	% de Recuperación
Puro	212,0	200,0	106
1:2	92,0	100,0	92
1:4	48,0	50,0	96
1:8	22,0	25,0	88
1:16	14,6	12,5	116
1:32	5,2	6,25	83

- El *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador 1* fue diluido con suero normal como se indica en la siguiente tabla y las distintas diluciones (muestras) fueron probadas en el *AphL ELISA® IgG e IgM HRP Kit*.
- Los valores esperados, en unidades MPL, fueron calculados dividiendo la concentración del *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador 1* por el factor de dilución.
- Los valores observados, en unidades MPL, fueron derivados de la curva de calibración.

Tabla 9: Recuperación del *AphL ELISA® HRP IgM Calibrador 1*

Dilución del Calibrador	MPL Observado	MPL Esperado	% de Recuperación
Neat	200,7	200,0	100
1:2	86,8	100,0	87
1:4	53,6	50,0	106
1:8	19,2	25,0	77
1:16	12,6	12,5	100
1:32	7,9	6,25	126

11 – BIBLIOGRAFIA

1. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis. *Lancet*. 1983 Nov 26;2(8361):1211-4.
2. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol*. 1987 Oct;26(5):324-6.
3. Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies-autoantibodies with a difference. *Annu Rev Med* 1988;39: 261-71.
4. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, Chan JK, Englert H, Mantelli P, Allegro F, Balliestieri G, Hughes GR. Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. *J Clin Lab Immunol*. 1985 Aug;17(4):155-62.
5. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood*. 1987 Jul;70(1):69-76.
6. Derksen RH, Biesma D, Bouma BN, Gmelig Meyling FH, Kater L. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum*. 1986 Oct;29(10):1295-6.
7. Lockshin MD, Qamar T, Druzyn ML, Goei S. Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant, and fetal death. *J Rheumatol*. 1987 Apr;14(2):259-62.
8. Triplett DA, Brandt JT. Lupus anticoagulants: misnomer, paradox, riddle, epiphenomenon. *Hematol Pathol*. 1988;2(3):121-43.
9. Vaarala O, Palosuo T, Kleemola M, Aho K. Anticardiolipin response in acute infections. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986 Oct;41(1):8-15.
10. Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1990 Jan;74(1):1-9.
11. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Miyawaki N, Morse JH, Zarrabi MH, Lockshin MD. Characteristics of HIV and chlorpromazine induced antiphospholipid antibodies: effect of β_2 Glycoprotein I on binding to phospholipid. *J Rheumatol* 1994 Jan;21(1):94-9.
12. Pierangeli SS, Goldsmith DH, Kmic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. *Infect Immun*. 1994 Sep;62(9):4081-4.
13. Harris EN, Pierangeli SS. A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol Newslet* 1995 15:2628-30.
14. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Harris EN, Polisson RP. Comparison between the standard anticardiolipin antibody test and a new phospholipid test in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 1999 Mar;26(3):591-6.
15. 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 Apr;68(1):215-22.
16. Harris EN. Special report. The second international anti-cardiolipin standardization workshop / the Kingston Anti-phospholipid Antibody Study (KAPS) Group. *Am J Clin Pathol*. 1990 Oct;94(4):476-84.
17. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol*. 1998 Jan;25(1):156-60.
18. Harris EN, Pierangeli SS. 'Equivocal' antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2000 Sep;15(2):81-5.
19. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol*. 2001 Mar;44(1):48-57; quiz 58-9.
20. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus*. 2002;11(5):269-75
21. Budd 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 #20 – Marzo 15, 2020

REF	LAPL-K-HRP-00GM
-----	-----------------