

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Cardioliipin IgG/IgM/IgA de ZEUS está diseñado para a la medición cualitativa *in vitro* anticuerpos de tipo IgG, IgM y/o IgA dirigidos contra cardioliipina en suero humano como ayuda en el diagnóstico del síndrome antifosfolipídico primario (SAFP) y del síndrome antifosfolipídico secundario (SAFS) en conjunción con otros resultados clínicos y analíticos.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Los autoanticuerpos contra fosfolípidos, y contra cardioliipina (aCL) en particular, se han asociado con la aparición de trombosis recurrente, trombocitopenia y abortos espontáneos (1,2,3). Se observa aCL en pacientes con lupus eritematoso sistémico u otras enfermedades del tejido conjuntivo (4), en individuos que reciben tratamiento con clorpromazina (5), y también en personas que no tienen enfermedades crónicas.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA Cardioliipin IgG/IgM/IgA de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG/IgM/IgA contra cardioliipina en suero humano. Los pocillos de las tirillas de micropocillos de plástico se sensibilizan mediante adsorción pasiva con antígenos de cardioliipina. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG/IgM/IgA humana de cabra conjugada con HRP a los pocillos y se incuban la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado inmovilizado se incuban con solución de sustrato. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y diluyente de la muestra.**

| | | |
|-------------|----|---|
| PLATE | 1. | Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno de cardioliipina de corazón bovino. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante. |
| CONJ | 2. | Conjugado: anti-IgG/IgM/IgA humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar. |
| CONTROL + | 3. | Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo. |
| CAL | 4. | Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul. |
| CONTROL - | 5. | Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde. |
| DIL SPE | 6. | Diluyente de la muestra: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Solución de color verde, lista para su uso. |
| SOLN TMB | 7. | TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar. |
| SOLN STOP | 8. | Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar. |
| WASHBUF 10X | 9. | Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2. |

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

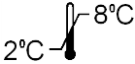
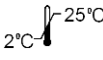
1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deseche de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que estén ausentes agentes infecciosos, estos productos deben ser manejados según el Nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda para cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos): última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (5).
5. Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente para muestras, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavado con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.

8. La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
15. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
22. Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

| | |
|---|---|
|  | Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul. |
| | Conjugado: NO CONGELAR. Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente para muestras sin abrir |
|  | Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C |

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

1. ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
2. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
3. Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (8, 9). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
4. Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8 °C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (13).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
2. Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

| EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA | | |
|--------------------------------------|------------------|------------|
| | 1 | 2 |
| A | Blanco | Paciente 3 |
| B | Control negativo | Paciente 4 |
| C | Calibrador | etc. |
| D | Calibrador | |
| E | Calibrador | |
| F | Control positivo | |
| G | Paciente 1 | |
| H | Paciente 2 | |

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente para muestras) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente.
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente para muestras al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 - Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
- Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
- Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

- Diluya el suero 1:21.
- Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 25 ± 5 minutos.
- Lave.
- Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 25 ± 5 minutos.
- Lave.
- Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 10 - 15 minutos.
- Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
- LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

- El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
- Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
- El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

| | Intervalo de DO |
|------------------|-----------------|
| Control negativo | ≤ 0,250 |
| Calibrador | ≥ 0,300 |
| Control positivo | ≥ 0,500 |

- El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
 - El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
 - Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
- Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
 - Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
 - Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- a. **Factor de corrección:** El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. **Límite de referencia de la DO:** Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)
- c. **Valores índice/cocientes de DO:** Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

| | | |
|---|--|------------------------|
| Ejemplo: DO media del calibrador | | = 0,793 |
| Factor de corrección (FC) | | = 0,25 |
| Límite de referencia de la DO | | = 0,793 x 0,25 = 0,198 |
| DO de muestra desconocida | | = 0,432 |
| Valor índice/cociente de DO de la muestra | | = 0,432/0,198 = 2,18 |

2. Interpretaciones: Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

| | Valor índice/cociente de DO |
|--------------------|-----------------------------|
| Muestras negativas | ≤0,90 |
| Muestras dudosas | 0,91 a 1,09 |
| Muestras positivas | ≥1,10 |

- a. Un cociente de DO < 0,9 indica que no hay anticuerpos IgG/IgM/IgA detectables contra cardiolipina y se debe comunicar como negativo para anticuerpos IgG/IgM/IgA contra cardiolipina.
- b. Un cociente de DO ≥ 1,10 es positivo para el anticuerpo IgG/IgM/IgA contra cardiolipina.
- c. Vuelva a analizar por duplicado las muestras con valores del coeficiente de DO comprendidos en el intervalo dudoso (0,91 – 1,09). Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados del sistema de pruebas ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS. Los resultados de las pruebas anticardiolipina deberán interpretarse de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- Las características de funcionamiento de este dispositivo no están establecidas en muestras lipémicas, hemolizadas e ictericas, por lo que estas muestras no se deben estudiar con este método.
- Aunque la presencia de aCL se ha asociado con algunos tipos de LES (1 - 3), el significado clínico de aCL en ésta y otras enfermedades sigue siendo objeto de investigación.
- La significación clínica de los resultados de una prueba dependerá de su relación con otros datos médicos del paciente. El diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad deberán basarse en la evaluación de toda la información pertinente del paciente.
- Un alto porcentaje de pacientes seropositivos para sífilis o con sífilis activa confirmada pueden presentar niveles elevados de aCL (10). Se han de realizar procedimientos de confirmación para descartar la sífilis.
- aCL ACL también se pueden encontrar en las infecciones como la hepatitis C (11), malaria, enfermedad de Lyme y VIH; leucemias y tumores malignos de órganos sólidos, y con frecuencia en la cirrosis alcohólica (12).
- No se han establecido las características de funcionamiento de este dispositivo para otras matrices distintas del suero.

RESULTADOS ESPERADOS

1. Datos demográficos y distribución por edad de la población para quien está pensado su uso:

Se analizaron en tres laboratorios trescientas tres (303) muestras enviadas para el análisis de los anticuerpos anticardiolipina, 294 muestras de donantes de sangre y 503 muestras definidas clínicamente. El laboratorio uno fue el fabricante, situado en Nueva Jersey. El laboratorio dos fue un laboratorio hospitalario, que también se encuentra en Nueva Jersey. El laboratorio tres fue un laboratorio hospitalario ubicado en Pensilvania. Cada laboratorio analizó un tercio de las muestras de cada grupo de población. El volumen total de muestras analizadas fue 1223. En la Tabla 1 se resumen los resultados de los datos demográficos de los pacientes. Asimismo, se analizaron noventa y ocho (98) muestras de pacientes con diagnóstico de SAFP y 25 muestras de pacientes con diagnóstico de SAFS en un solo laboratorio, situado en Nueva Jersey. Estos resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 1: Datos demográficos para las poblaciones sometidas a prueba

| Poblaciones | Cantidad analizada | Varones | Mujeres | Desconocido | Edad media |
|--|--------------------|---------|---------|-------------|------------|
| Muestras enviadas para el análisis de anticuerpos anticardiolipina | 303 | 102 | 201 | 0 | 48,3 |
| Donantes de sangre | 294 | 145 | 149 | 0 | 41,9 |
| Muestras definidas clínicamente | 503 | 65 | 430 | 8 | 41,3 |
| Muestras de SAFP | 98 | * | * | * | * |
| Muestras de SAFS | 25 | 6 | 19 | 0 | 42,1 |

*No disponible

2. Muestras caracterizada de pacientes con síndrome antifosfolipídico primario y síndrome antifosfolipídico secundario:

Se obtuvieron de un laboratorio médico y se analizaron noventa y ocho (98) muestras de pacientes con SAFP y 25 muestras de pacientes de SAFS. La concordancia con el diagnóstico clínico se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Análisis de los sueros caracterizados procedentes de pacientes diagnosticados con SAFP y SAFS

| Sistema de pruebas | Muestras de SAFP | | | % concordancia con el diagnóstico clínico Presentado con un IC del 95% | |
|---------------------------------------|------------------|--------|-------|--|-------------|
| | Positivo | Normal | Total | | |
| ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | 83 | 15 | 98 | 84,7 (83/98) | 74,0 - 91,2 |
| | Muestras de SAFS | | | | |
| ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | 23 | 2 | 25 | 92,0 (23/25) | 74,0 - 99,0 |

3. Prevalencia en las poblaciones seleccionadas:

Se calculó la prevalencia en las poblaciones seleccionadas para los cuales se solicitó el análisis de los anticuerpos anticardiolipina y en los donantes de sangre normales. Asimismo, se calculó la prevalencia en las poblaciones seleccionadas de pacientes con diversos trastornos autoinmunes o de la coagulación, y en mujeres embarazadas con antecedentes de preeclampsia.

Tabla 3: Estudio del intervalo de referencia para los anticuerpos anticardiolipina

| Población | Resultados de ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | | | % de prevalencia observada Anticuerpos anticardiolipina |
|--|---|----------|-------|---|
| | Positivo | Negativo | Total | |
| Sueros enviados para el análisis de anticuerpos anticardiolipina | 47 | 256 | 303 | 15,50 |
| Sueros procedentes de una población sana de donantes de sangre | 10 | 284 | 294 | 3,40 |

Tabla 4: Estudio clínico para los anticuerpos anticardiolipina

| Población | Resultados de ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | | | % de prevalencia observada Anticuerpos anticardiolipina |
|---------------------|---|----------|-------|---|
| | Positivo | Negativo | Total | |
| Trombocitopenia | 2 | 8 | 10 | 20,0 |
| Preeclampsia | 0 | 25 | 25 | 0,0 |
| EMTC | 4 | 39 | 43 | 9,3 |
| ESP | 2 | 74 | 76 | 2,6 |
| Artritis reumatoide | 22 | 249 | 271 | 8,1 |
| Síndrome de Sjögren | 0 | 11 | 11 | 0,0 |
| LES | 13 | 30 | 43 | 30,2 |
| Vasculitis | 0 | 17 | 17 | 0,0 |
| Total de enfermos | 43 | 453 | 496 | 8,7 |

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo:

El sistema de pruebas ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS se comparó con sistemas de pruebas ELISA comerciales para la detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA contra cardiolipina. El estudio clínico incluyó 1100 muestras de suero. Se compraron a un proveedor de suero trescientas tres (303) muestras de pacientes para los cuales se solicitó el análisis de los anticuerpos anticardiolipina. Doscientas noventa y cuatro (294) muestras procedían de donantes de sangre sanos, y se compraron a un proveedor de suero. Quinientas tres (503) muestras procedían de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes, trombocitopenia, preeclampsia y sueros solicitado como positivos para anticuerpos anticardiolipina, y fueron adquiridas a fuentes comerciales.

Tabla 5: Resumen de la prueba comparativa

| ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | Sistema de pruebas comparativos | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------|----------|-----------------------|---------|-------------|
| | | Positivo | Negativo | Total del laboratorio | PPA/NPA | IC del 95% |
| | Positivo | 78 | 20 | 98 | 86,7% | 77,9 - 92,9 |
| | Negativo | 12 | 696 | 708 | 97,2% | 95,7 - 98,3 |
| Total del laboratorio | 90 | 716 | 806 | | | |

Tabla 6:

| ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS | Sistema de pruebas comparativos | | | | | |
|---------------------------------------|--|----------|----------|-----------------------|---------|-------------|
| | Muestras definidas clínicamente | | | | | |
| | | Positivo | Negativo | Total del laboratorio | PPA/NPA | IC del 95% |
| | Positivo | 33 | 18 | 51 | 82,5% | 67,2 - 92,7 |
| | Negativo | 7 | 445 | 452 | 96,1% | 93,9 - 97,7 |
| | Total del laboratorio | 40 | 463 | 503 | | |
| | Muestras enviadas para el análisis de anticuerpos anticardiolipina | | | | | |
| | | Positivo | Negativo | Total del laboratorio | NPA | IC del 95% |
| | Positivo | 45 | 2 | 47 | 90,0% | 78,2 - 96,7 |
| | Negativo | 5 | 251 | 256 | 99,2% | 97,2 - 100 |
| | Total del laboratorio | 50 | 253 | 303 | | |

Nota: las muestras que fueron dudosas mediante la metodología comparativa fueron tratadas como negativas en los cálculos

Tabla 7: Especificidad analítica (evaluada en tres laboratorios)

| Población | Número | Negativo | Positivo | % positividad* |
|--------------------|--------|----------|----------|----------------|
| Donantes de sangre | 294 | 284 | 10 | 3,4 |

*Se observó que el % de positividad con los métodos comparativos fue de: 4,4%

2. Reproducibilidad:

La precisión y la reproducibilidad se evaluaron internamente y en dos laboratorios clínicos externos. El estudio se llevó a cabo de la siguiente manera: 12 muestras fueron identificadas y/o preparadas para utilizarlas en el estudio basándose en su actividad en el ensayo. Se seleccionaron dos muestras de cada tipo: altamente positivas (1 y 2), moderadamente positivas (3 y 4), escasamente positivas (5 y 6), cercanas al límite de referencia (7 y 8), altamente negativa (9 y 10), y escasamente negativa (11 y 12). También se utilizaron los controles positivos y negativos y el calibrador del sistema de prueba para evaluar la precisión y la reproducibilidad. En cada día de la prueba, cada muestra se diluyó dos veces y cada dilución se analizó por triplicado. Este proceso lo repitió un segundo técnico lo que dio como resultado doce resultados por día. Esto se repitió durante cinco días en cada sitio y los datos resultantes se utilizaron para evaluar la reproducibilidad.

Tabla 8: Resumen de la precisión y reproducibilidad

| | | | Laboratorio uno | | | | | Laboratorio dos | | | | | Laboratorio tres | | | | |
|---------|----|--------------------|-----------------|------------|------------|------------------------------|-------|-----------------|------------|------------|------------------------------|-------|------------------|------------|------------|------------------------------|-------|
| Muestra | N | Resultado esperado | VI medio | % positivo | % negativo | Intervalo de resultados (VI) | | VI medio | % positivo | % negativo | Intervalo de resultados (VI) | | VI medio | % positivo | % negativo | Intervalo de resultados (VI) | |
| | | | | | | Baja | Alta | | | | Baja | Alta | | | | Baja | Alta |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 60 | Positivo | 5,43 | 100 | 0 | 4,700 | 6,110 | 5,48 | 100 | 0 | 4,540 | 6,480 | 5,30 | 100 | 0 | 4,5 | 6,29 |
| 2 | 60 | Positivo | 5,58 | 100 | 0 | 4,660 | 6,270 | 5,54 | 100 | 0 | 4,710 | 6,380 | 5,20 | 100 | 0 | 4,53 | 5,73 |
| 3 | 60 | Positivo | 2,49 | 100 | 0 | 2,066 | 2,799 | 2,50 | 100 | 0 | 2,103 | 2,946 | 2,29 | 100 | 0 | 1,839 | 2,57 |
| 4 | 60 | Positivo | 2,32 | 100 | 0 | 1,905 | 2,846 | 2,40 | 100 | 0 | 2,004 | 3,274 | 2,23 | 100 | 0 | 1,815 | 2,88 |
| 5 | 60 | Positivo | 1,45 | 100 | 0 | 1,123 | 1,767 | 1,53 | 100 | 0 | 1,275 | 2,272 | 1,28 | 100 | 0 | 1,066 | 1,612 |
| 6 | 60 | Positivo | 1,38 | 100 | 0 | 1,086 | 1,638 | 1,46 | 100 | 0 | 1,057 | 1,725 | 1,32 | 100 | 0 | 1,036 | 1,556 |
| 7 | 60 | Negativo | 0,97 | 36,7 | 63,3 | 0,728 | 1,150 | 1,06 | 73,3 | 26,7 | 0,887 | 1,179 | 0,94 | 25,0 | 75,0 | 0,771 | 1,124 |
| 8 | 60 | Negativo | 0,86 | 2 | 98,3 | 0,694 | 1,020 | 0,96 | 75 | 25,0 | 0,801 | 1,099 | 0,84 | 2 | 98,3 | 0,705 | 1,025 |
| 9 | 60 | Negativo | 0,54 | 0 | 100,0 | 0,426 | 0,912 | 0,64 | 0 | 100 | 0,475 | 0,817 | 0,56 | 0 | 100 | 0,45 | 0,671 |
| 10 | 60 | Negativo | 0,60 | 0 | 100 | 0,431 | 0,766 | 0,64 | 0 | 100 | 0,482 | 0,833 | 0,55 | 0 | 100 | 0,423 | 0,685 |
| 11 | 60 | Negativo | 0,23 | 0 | 100 | 0,151 | 0,417 | 0,23 | 0 | 100 | 0,169 | 0,289 | 0,19 | 0 | 100 | 0,113 | 0,238 |
| 12 | 60 | Negativo | 0,30 | 0 | 100 | 0,208 | 0,580 | 0,31 | 0 | 100 | 0,235 | 0,531 | 0,24 | 0 | 100 | 0,175 | 0,314 |
| NC | 60 | Negativo | 0,10 | 0 | 100 | 0,064 | 0,138 | 0,09 | 0 | 100 | 0,058 | 0,169 | 0,06 | 0 | 100 | 0,026 | 0,09 |
| Cal. | 60 | Positivo | 3,26 | 100 | 0 | 2,655 | 3,655 | 3,27 | 100 | 0 | 2,748 | 4,888 | 3,25 | 100 | 0 | 2,859 | 3,52 |
| Cal. | 60 | Positivo | 3,26 | 100 | 0 | 2,831 | 3,741 | 3,26 | 100 | 0 | 2,833 | 4,65 | 3,22 | 100 | 0 | 2,735 | 3,456 |
| Cal. | 60 | Positivo | 3,19 | 100 | 0 | 2,756 | 3,611 | 3,25 | 100 | 0 | 2,759 | 3,736 | 3,28 | 100 | 0 | 2,995 | 3,576 |
| PC | 60 | Positivo | 6,15 | 100 | 0 | 5,375 | 6,650 | 5,98 | 100 | 0 | 5,241 | 6,724 | 6,11 | 100 | 0 | 5,435 | 7,001 |

3. Reactividad cruzada:

Se llevaron a cabo estudios en las instalaciones de fabricación para evaluar la reactividad cruzada con el sistema de pruebas ELISA IgG/IgM/IgA Screen de ZEUS utilizando muestras que fueron seropositivas para AAN, ADNcd, FR, rubeola, VHS 1, VHS 2, VZV, sarampión, paperas, VHC y sífilis. Para determinar la seropositividad de las muestras se utilizaron los sistemas de prueba de inmunoensayo AtheNA Multi-Lyte y ELISA, fabricados para su distribución comercial. Se analizaron diez muestras para cada posible agente de reacción cruzada. Los resultados presentados se obtuvieron probando los analitos frente a altas concentraciones de posibles agentes de reacción cruzada, y se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Reactividad cruzada

| Estudio de reactividad cruzada - Sistema de pruebas ELISA Cardiolipin IgG/IgA/IgM de ZEUS | |
|---|--------------------|
| Analito | Positivo/Analizado |
| AAN | 0/10 |
| ADN | 0/10 |
| VHS 1 | 0/10 |
| VHS 2 | 0/10 |
| Sarampión | 0/10 |
| Paperas | 0/10 |
| IgM anti FR | 0/10 |
| Rubeola | 0/10 |
| Sífilis | 0/10 |
| VHC | 0/10 |
| VZV | 0/10 |

4. Sustancias interferentes:

El efecto de sustancias potencialmente interferentes en los resultados de las muestras generados utilizando el ensayo fue evaluado con las siguientes posibles sustancias interferentes: albúmina, bilirrubina, colesterol, hemoglobina, triglicéridos e intralípidos. La cantidad de analito en casa sustancia interferente es la siguiente:

- Bilirrubina: 1 mg/dl (bajo), 15 mg/dl (alto)
- Albúmina: 3,5 g/dl (bajo), 5 g/dl (alto)
- Colesterol: 150 mg/dl (bajo), 250 mg/dl (alto)
- Triglicéridos: 150 mg/dl (bajo), 500 mg/dl (alto)
- Hemoglobina: 10 g/dl (bajo), 20 g/dl (alto)
- Intralípidos: 300 mg/dl (bajo), 750 mg/dl (alto)

Todas las muestras positivas mostraron un cambio de señal de menos de un 20%. Las muestras en el límite mostraron un cambio de señal de menos de un 20% con excepción del alto pico de albúmina (28,3%), intralípidos (31,4%) y colesterol (35,7%). La muestra negativa mostró una reducción de la señal > 20% con el alto pico de hemoglobina (-21,2%) y un aumento de la señal con los altos picos de colesterol (32,5%) y de triglicéridos (44,9%) y con el bajo pico de colesterol (68,3%). Los resultados de las muestras negativas en cada caso permanecieron por debajo del punto de corte y el cambio en señal no afectó el resultado cualitativo.

Tabla 10: Estudio de sustancias interferentes con el ELISA Cardiolipin IgG/IgM/IgA de ZEUS

| Nivel cargado | Muestra positiva | | | Muestra límite | | | Muestra negativa | | |
|-------------------------|------------------|-----------|------------------|----------------|-----------|------------------|------------------|-----------|------------------|
| | Valor índice | Resultado | % señal positiva | Valor índice | Resultado | % señal positiva | Valor índice | Resultado | % señal positiva |
| Control neto | 8,60 | Positivo | | 1,20 | Positivo | | 0,36 | Negativo | |
| Albumina 3,5 g/dl | 9,70 | Positivo | 112,8 | 1,54 | Positivo | 128,3 | 0,33 | Negativo | 93,0 |
| Albumina 5 g/dl | 9,79 | Positivo | 113,8 | 1,47 | Positivo | 122,0 | 0,36 | Negativo | 100,8 |
| Hemoglobina 10 g/dl | 8,25 | Positivo | 96,0 | 0,99 | Negativo | 82,5 | 0,28 | Negativo | 78,8 |
| Hemoglobina 20 g/dl | 8,54 | Positivo | 99,2 | 0,98 | Negativo | 81,5 | 0,30 | Negativo | 83,3 |
| Intralípidos 300 g/dl | 9,45 | Positivo | 109,8 | 1,58 | Positivo | 131,4 | 0,30 | Negativo | 84,7 |
| Intralípidos 750 g/dl | 9,80 | Positivo | 114,0 | 1,40 | Positivo | 116,1 | 0,36 | Negativo | 101,4 |
| Control de PBS | 9,30 | Positivo | | 1,36 | Positivo | | 0,32 | Negativo | |
| Bilirrubina 1 mg/dl | 8,82 | Positivo | 94,9 | 1,41 | Positivo | 103,8 | 0,29 | Negativo | 91,9 |
| Bilirrubina 15 mg/dl | 8,93 | Positivo | 96,0 | 1,32 | Positivo | 97,6 | 0,26 | Negativo | 80,3 |
| Control de etanol | 8,95 | Positivo | | 1,14 | Positivo | | 0,24 | Negativo | |
| Colesterol 150 mg/dl | 9,40 | Positivo | 104,9 | 1,55 | Positivo | 135,7 | 0,32 | Negativo | 132,5 |
| Colesterol 250 mg/dl | 8,80 | Positivo | 98,2 | 1,06 | Positivo | 92,7 | 0,41 | Negativo | 168,3 |
| Triglicéridos 150 mg/dl | 9,23 | Positivo | 103,1 | 1,19 | Positivo | 104,4 | 0,35 | Negativo | 144,9 |
| Triglicéridos 500 mg/dl | 8,23 | Positivo | 91,9 | 0,97 | Negativo | 85,1 | 0,27 | Negativo | 110,7 |

REFERENCIAS

- Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* ii:1211-1214, 1983.
- Hamsten A, Norberg R, Gjorkholm M, DeFaire U, Holm G: Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: an association with recurrent cardiovascular events. *Lancet* i: 113-116, 1986.
- Harris EN, Asherson RA, Gharavi AE, Morgan SH, Berue G, Hughes GRV: Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: association with anticardiolipin antibody. *Br. J. Hematol.* 59: 231-234, 1985.
- deBrum-Gernandes AJ, Cossermelli-Messina W, Bueno C, Santiago MB, Weidebach W, Cossermelli W, deOliveira RM: Anticardiolipin antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 8:484-488, 1989.
- Canoso RT, deOliveira RM, Nixon RA: Neuroleptic-associated autoantibodies: a prevalence study. *Biol. Psychiatry* 27:863-870, 1990.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Fed. Register* 56:64175-64182, 1991.
- Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. *NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12), 1997.*
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. *NCCLS/CLSI Document H18-A, Vol. 10, No. 12. Approved Guideline 1990.*
- Tringali GR, Julian AJ, Halbert WM: Effect of 2-mercaptoethanol treatment on anticardiolipin reactivity in sera from syphilitic and false positive reactors. *The British Journal of Venereal Diseases, Vol.45 (3):202-4, 1969.*
- Cacoub, P., L. Musset, Z. Amoura, P. Guilani, H. Chabre, F. Lunel, T. Poynard, P. Opolon, and J.-C. Piette. Anticardiolipin, anti-β₂-glycoprotein I, and antinucleosome antibodies in hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Multivirc Group. J. Rheumatol.* 24:2139-2144, 1997.
- Chedid, A., K. R. Chadalawada, T. R. Morgan, T. E. Moritz, C. L. Mendenhall, J. B. Hammond, P. W. Emblad, D. C. Cifuentes, J. W. H. Kwak, A. Gilman-Sachs, and K. D. Beaman. Phospholipid antibodies in alcoholic liver disease. *Hepatology* 20:1465-1471, 1994.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). *CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.*



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA y SAVE Diluent[®] son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
 Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

| | | |
|-----------|------------|--|
| EC | REP | EMERGO EUROPE Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands |
|-----------|------------|--|