



COD 44780 96 Determinaciones

CONSERVAR A 2-8°C

Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-cardiolipina (ACA)  
Sólo para uso *in vitro* en el laboratorio clínico**ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA  
(ACA)**Enzimoinmunoensayo  
PRUEBA EN MICROPLACA**FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Los anticuerpos anti-cardiolipina (ACA) del suero, en presencia de  $\beta_2$ -glicoproteína I, se unen a la cardiolipina adsorbida a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humanas conjugado con peroxidasa. Finalmente, se añade el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con  $H_2O_2$ , sustrato que da lugar a un producto soluble de color amarillo. La reacción enzimática se detiene con ácido sulfúrico y la formación de producto se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto en la reacción<sup>1</sup>.

**CONTENIDO Y COMPOSICIÓN**

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 100 mL. Tampón fosfatos concentrado, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,2.
- B. Diluyente de Muestra.** 50 mL. Tampón fosfatos 10 mmol/L, cloruro de sodio 130 mmol/L, azida de sodio 15 mmol/L y suero bovino. Coloreado azul.
- C+. Control Positivo IgG.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-cardiolipina tipo IgG, azida de sodio 15 mmol/L. Tapón amarillo.
- C+. Control Positivo IgM.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-cardiolipina tipo IgM, azida de sodio 15 mmol/L. Tapón violeta.
- C-. Control Negativo.** 2 mL. Listo para su uso. Suero humano libre de anticuerpos anti-cardiolipina, azida de sodio 15 mmol/L. Tapón incoloro.
- Dg. Conjugado IgG.** 6 mL. Anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa. Coloreado amarillo.
- Dm. Conjugado IgM.** 6 mL. Anti-inmunoglobulina M humana conjugada con peroxidasa. Coloreado violeta.
- E. Sustrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
- M. Microplaca:** 96 pocillos separables individualmente recubiertos con cardiolipina.
- S1G-S6G. Patrones ACA IgG,** calibrados usando unidades estándar anti-cardiolipina (unidades GPL). 1 mL, listos para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-fosfolípidos tipo IgG, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de ACA IgG son 0, 10, 20, 50, 100 y 200 GPL, según se indica en la etiqueta. Tapón amarillo.
- S1M-S6M. Patrones ACA IgM,** calibrados usando unidades estándar anti-cardiolipina (unidades MPL). 1 mL, listos para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-fosfolípidos tipo IgM, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de ACA IgM son 0, 10, 20, 50, 100 y 200 MPL, según se indica en la etiqueta. Tapón violeta.

Los sueros humanos utilizados en la preparación de los patrones, del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los patrones y los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

**CONSERVACIÓN**

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

**Indicaciones de deterioro:**

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

**PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS**

**Tampón de Lavado.** Efectuar una dilución 1/20 del Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada y mezclar. Se necesitan aproximadamente 50 mL de Tampón de Lavado para el lavado de una tira. Una vez diluido, el reactivo es estable 7 días a 2-8°C (Nota 1).

Los demás componentes están listos para su uso.

**EQUIPO ADICIONAL**

- Cámara húmeda.
- Aspirador multicanal o lavador automático de microplacas.
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta y filtro de 450±10 nm.

**MUESTRAS**

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/50 en Diluyente de Muestra (B) antes del ensayo.

**PROCEDIMIENTO**

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Abrir la bolsa de la microplaca y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 3).
3. **Determinación cuantitativa:** Pipetear 50  $\mu$ L de cada uno de los patrones IgG (S1G-S6G), o patrones IgM (S1M-S6M), Control Positivo IgG (C+1) o Control Positivo IgM (C+2), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.  
**Determinación cualitativa:** Pipetear 50  $\mu$ L de Control Positivo IgG (C+1) o Control Positivo IgM (C+2), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100  $\mu$ L de Diluyente de Muestra (B) en un pocillo para el blanco.
4. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido y lavar los pocillos con 300  $\mu$ L de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 4 veces (Notas 4 y 5).
6. Pipetear 50  $\mu$ L de Conjugado IgG (Dg, amarillo) o Conjugado IgM (Dm, violeta) en cada uno de los pocillos (Nota 6).
7. Incubar los pocillos como en el paso 4.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 50  $\mu$ L de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar las tiras durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100  $\mu$ L de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 7).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón S1G ó S1M, o el blanco para el ajuste a 0. El color es estable durante al menos 1 hora.

## CÁLCULOS

**Determinación cuantitativa.** Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Patrones frente a sus respectivas concentraciones de anticuerpos anti-cardiolipina (unidades GPL o MPL). La concentración de anticuerpos anti-cardiolipina en la muestra se calcula por interpolación de la absorbancia en la curva de calibración.

**Determinación cualitativa.** Calcular la absorbancia del Valor Discriminante aplicando la siguiente fórmula:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Control Positivo} \times \text{Factor}$$

El valor del factor (F) viene indicado en la etiqueta del Control Positivo.

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de absorbancia} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ de la Muestra}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ del Valor Discriminante}}$$

Cuando se obtengan valores de absorbancia por encima del límite superior del rango del lector de microplacas, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la operación.

## VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con concentraciones superiores a 18 GPL o MPL o con razón de absorbancia superior a 1,2.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 12 GPL o MPL o con razón de absorbancia inferior a 0,8.

Las muestras con concentraciones comprendidas entre 12 y 18 GPL o MPL o con razones comprendidas entre 0,8 y 1,2 deben considerarse dudosas y se recomienda la repetición del ensayo o la determinación de parámetros alternativos de valor diagnóstico.

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

## CONTROL DE CALIDAD

El valor de absorbancia del Patrón 0 GPL (S1G) ó 0 MPL (S1M) debe ser inferior a 0,4.

La concentración del Control Positivo (C+) debe ser superior a 40 GPL o MPL y la del Control Negativo (C-) debe ser inferior a 12 GPL o MPL.

La razón de absorbancia para el Control Positivo (C+) debe ser superior a 1,2 y para el Control Negativo (C-) debe ser inferior a 0,8.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetibilidad (intra):

GPL	CV %	n
61	12	25
193	14	25

MPL	CV%	n
37	13	20
83	16	20

– Reproducibilidad (inter):

GPL	CV %	n
61	9	25
193	16	25

MPL	CV%	n
37	10	20
83	13	20

– Límite de Detección: 2,8 GPL y 0,5 MPL

- Rango de medida: 2,8–200 GPL y 0,5–200 MPL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la medición.
- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud
- Interferencias: El factor reumatoide (300 UI/mL) no interfiere. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir<sup>2</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Aunque fueron descritos por primera vez en enfermos de lupus eritematoso sistémico, los anticuerpos anti-cardiolipina están presentes en enfermos de síndrome antifosfolípidos. Los anticuerpos antifosfolípidos reaccionan con fosfolípidos cargados negativamente, incluida la cardiolipina<sup>3</sup>. Títulos elevados de anticuerpos anti-cardiolipina IgG o IgM en suero o plasma están asociados con un riesgo incrementado de trombosis y embolia pulmonar<sup>4</sup>, y con un importante factor de riesgo de padecer derrame cerebral<sup>5</sup> y aborto espontáneo recurrente<sup>6</sup>. Los títulos de anticuerpos anti-cardiolipina pueden disminuir durante el tratamiento con corticoesteroides<sup>7</sup>.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## NOTAS

1. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
2. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
3. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
4. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que debe pipetarse en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el Sustrato (E) en el paso 9.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997
3. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies Clin Rheum Dis. 1985;11(3):591-609.
4. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. Ann Intern Med.1992; 117(12): 997-1002.
5. Montalban J, Codina A, Ordi J, Vilardell M, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies in cerebral ischemia. Stroke 1991; 22(6):750-3.
6. Lynch A, Marlar R, Murphy J, Davila G, Santos M, Rutledge J, Emlen W. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. A prospective study. Ann Intern Med. 1994;120(6):470-5
7. Asherson RA and Cervera R. The Antiphospholipid Syndrome. In: Lahita RG, editor. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2000.