

BIO-RAD

REF 425-2040

L25206001ES00

Autoimmune EIA

Anti-Cardiolipin IgA Test

Manual de instrucciones

Autoimmune EIA
Anti-Cardiolipin IgA Test Kit, 96 Tests

IVD

CE













Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547, USA
FRANCE, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette

CD en varios idiomas

Este kit incluye un CD-ROM en los siguientes idiomas:

inglés, alemán, francés, español, italiano, portugués, sueco, danés y griego.

Símbolos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro

 <ul style="list-style-type: none"> • European Conformity • EG-Konformität • Conformité européenne • Conforme a la normativa europea • Conformità Europea • Conformidade com as normas europeias • Uppfyllet EU-direktiv • CE-mærkning • Συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς 	 <ul style="list-style-type: none"> • Manufacturer • Hersteller • Fabricant • Fabricante • Produttore • Fabricante • Tillverkare • Producent • Κατασκευαστής 	 <ul style="list-style-type: none"> • Authorized Representative in the European Union • Autorisierter Vertreter in der Europäischen Union • Représentant agréé pour l'Union Européenne • Representante Autorizado en la Unión Europea • Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea • Representante Autorizado da União Europeia • Auktoriserad EU-representant • Autoriseret repræsentant i EU • Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Ένωση
 <ul style="list-style-type: none"> • Lot Number • Chargenbezeichnung • Numéro de lot • Número de lote • Numero di lotto • Número do lote • Batchnummer • Lotnummer • Αριθμός παρτίδας 	 <ul style="list-style-type: none"> • Use by • Haltbar bis • Utiliser avant • Fecha de caducidad • Scadenza • Utilizar até • Användes före • Utlöbsdato • Ημερομηνία λήξης 	 <ul style="list-style-type: none"> • For In Vitro Diagnostic Use • In-vitro-Diagnostikum • Utilisation comme test de diagnostic in vitro • Para uso en diagnóstico in vitro • Per uso diagnostico in vitro • Para uso em diagnóstico in vitro • For in vitro-diagnostisk bruk • Til in vitro-diagnostisk bruk • Για in vitro διαγνωστική χρήση
 <ul style="list-style-type: none"> • Temperature Limit • Temperaturgrenze • Limite de température • Limite de temperatura • Limite di temperatura • Limite de temperatura • Temperaturgränser • Temperaturområde • Όριο θερμοκρασίας 	 <ul style="list-style-type: none"> • Catalog Number • Katalognummer • Référence • Número de catálogo • Numero di catalogo • Número de catálogo • Katalognummer • Katalognummer • Αριθμός καταλόγου 	 <ul style="list-style-type: none"> • Consult Instructions for Use • Gebrauchsanleitung beachten • Consulter la notice d'utilisation • Consulte las instrucciones de uso • Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso • Consulte as instruções de utilização • Se bruksanvisning före användande • Se brugsvejledningen • Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
 <ul style="list-style-type: none"> • Manufactured For • Hergestellt für • Fabriqué pour • Fabricado para • Prodotto per • Fabricado para • Tillverkas för • Produceret for • Κατασκευάζεται για λογαριασμό της 		

<p>IgA CAL 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Calibrator 1 • IgA Kalibrator 1 • Calibrateur d'IgA 1 • Calibrador de IgA 1 • Calibratore 1 per IgA • Calibrador IgA 1 • IgA-kalibrator 1 • IgA kalibrator 1 • Βαθμονομητής IgA 1 	<p>IgA CAL 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Calibrator 2 • IgA Kalibrator 2 • Calibrateur d'IgA 2 • Calibrador de IgA 2 • Calibratore 2 per IgA • Calibrador IgA 2 • IgA-kalibrator 2 • IgA kalibrator 2 • Βαθμονομητής IgA 2 	<p>IgA CAL 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Calibrator 3 • IgA Kalibrator 3 • Calibrateur d'IgA 3 • Calibrador de IgA 3 • Calibratore 3 per IgA • Calibrador IgA 3 • IgA-kalibrator 3 • IgA kalibrator 3 • Βαθμονομητής IgA 3 	<p>IgA CONJ</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Conjugate • IgA-Konjugat • Conjugué d'IgA • Conjugado de IgA • Coniugato IgA • Conjugado de IgA • IgA-konjugat • IgA konjugat • Συζυγές IgA
<p>IgA CONTROL -</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Negative Control • IgA-Negativkontrolle • Contrôle négatif d'IgA • Control negativo de IgA • Controllo negativo per IgA • Controllo Negativo IgA • IgA-negativ kontroll • IgA negativ kontroll • Αρνητικός μάρτυρας IgA 	<p>IgA CONTROL +</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Positive Control • IgA-Positivkontrolle • Contrôle positif d'IgA • Control positivo de IgA • Controllo positivo per IgA • Controllo Positivo IgA • IgA-positiv kontroll • IgA positiv kontroll • Θετικός μάρτυρας IgA 	<p>IgA MPLT</p> <ul style="list-style-type: none"> • IgA Microplate • IgA-Mikrotiterplatte • Microplaque IgA • Microplaca de IgA • Microplastr per IgA • Microplaca IgA • IgA-mikroplatta • IgA mikroplade • Μικροπλάκα IgA 	<p>SAMP DIL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sample Diluent • Probendiluent • Diluant d'échantillon • Diluyente para muestras • Diluente per campione • Diluente de Amostras • Provdiluent • Prøvefortynder • Αραιωτικό δείγμάτων
<p>STOP</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stop Solution • Stoppösung • Solution d'arrêt • Solución de parada • Soluzione bloccante • Solução de Paragem • Stoppösning • Stoppöslösning • Ανασχετικό διάλυμα 	<p>SUBS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Substrate • Substrat • Substrat • Substrat • Substrato • Substrato • Substrat • Substrat • Υπόστρωμα 	<p>WSH CONC</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wash Concentrate • Waschkonzentrat • Solution de lavage concentrée • Concentrado de lavado • Soluzione di lavaggio concentrata • Concentrado de Lavagem • Tvättkoncentrat • Vaskekonzentrat • Συμπύκνωμα πλύσης 	

Índice

Página

Indicaciones.....	2
Resumen y explicación de la prueba.....	2
Principios del procedimiento.....	2
Componentes del kit.....	3
Elementos adicionales necesarios.....	4
Precauciones y advertencias.....	4
Notas del procedimiento.....	5
Recogida y manipulación de las muestras.....	6
Preparación y almacenamiento de los reactivos.....	6
Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos.....	7
Procedimiento.....	7
Pasos del análisis.....	7
Requisitos del control de calidad.....	8
Pautas para la interpretación de los resultados.....	8
Limitaciones del procedimiento.....	10
Rango de valores esperados.....	11
Características de rendimiento.....	11
Especificidad.....	11
Sensibilidad.....	11
Precisión.....	11
Recuperación.....	12
Información de seguridad del producto.....	12
Referencias.....	13

INDICACIONES

Análisis enzimático inmunoabsorbente (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgA anticardiolipina en suero o plasma humanos.

Para la detección y semicuantificación de anticuerpos anticardiolipina en personas con lupus eritematoso disseminado (LED) y trastornos seudolúpicos (síndrome antifosfolípido).

Para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los anticuerpos antifosfolípidos son autoanticuerpos que reaccionan con la mayoría de los fosfolípidos cargados negativamente, incluida la cardiolipina (CL)^{1,2}. Además, se sabe que los anticuerpos antifosfolípidos prolongan las pruebas de coagulación in vitro dependientes de fosfolípidos, y se han denominado tradicionalmente «anticoagulante lúpico»^{1,3,4}. Paradójicamente, las personas con el anticoagulante lúpico no presentan hemorragias anormales, excepto en presencia de otras anomalías hemostáticas³.

Los anticuerpos anticardiolipina (aCL) suelen encontrarse frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso disseminado (LED). También se encuentran en personas que padecen otras enfermedades autoinmunitarias, así como en otras que no sufren ninguna enfermedad subyacente aparente^{1,5,6}. Se han descrito concentraciones altas de anticuerpos aCL asociadas significativamente a la presencia de trombosis arterial y venosa, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente. Para describir a las personas que presentan estas manifestaciones clínicas, junto con los anticuerpos aCL o el anticoagulante lúpico, se ha acuñado el término «síndrome antifosfolípido» (APS)⁶⁻¹⁰.

Las concentraciones séricas altas de anticuerpos IgG aCL son más prevalentes y más relevantes clínicamente que las de anticuerpos IgM aCL cuando se relacionan con las manifestaciones clínicas del APS¹¹⁻¹⁴. Se han realizado estudios que indican que las concentraciones séricas altas de anticuerpos IgA aCL también se encuentran con frecuencia en pacientes con LED y trastornos relacionados^{2,15-17}. Las concentraciones séricas de IgA aCL fueron significativamente superiores en los enfermos de LED con complicaciones vasculares que en los que no sufrían dichas complicaciones¹⁵, y se asociaron a una predisposición a la trombosis, la trombocitopenia y la muerte fetal^{16,18}.

El kit de Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin Test de Bio-Rad utiliza un conocido formato de ELISA para detectar anticuerpos aCL en suero o plasma humanos. Los inmunoanálisis de fase sólida se consideran generalmente más sensibles¹⁰ y más específicos¹⁹ que los análisis de coagulación para detectar anticuerpos aCL. El kit de Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin Test de Bio-Rad ofrece resultados rápidos, altamente reproducibles, precisos y objetivos en unidades homologables con una preparación de referencia internacionalmente reconocida. Los valores de anticuerpos IgA aCL se expresan en unidades APL (IgA antifosfolípidos).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba se realiza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero, los sueros calibradores y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de cardiolipina, lo que permite que los anticuerpos aCL presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Después de eliminar las proteínas séricas no unidas mediante lavado, se añaden anticuerpos anti-IgA humana marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos a la cardiolipina. Tras otro paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H₂O₂) como sustrato cromógeno. El color se desarrolla en los pocillos a una intensidad proporcional a la concentración sérica de anticuerpos aCL.

Los resultados se obtienen determinando la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un espectrofotómetro. Se suministran sueros calibradores con las concentraciones de IgA aCL expresadas en unidades APL.

Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin IgA Test

Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anticardiolipina en la muestra se ofrecen opciones de una curva de calibración de cuatro puntos y de una curva de calibración de un solo punto.

COMPONENTES DEL KIT

El kit de Anti-Cardiolipin IgA Test de Bio-Rad contiene suministros para 96 pruebas:

Componente	REF	Descripción	Kit para 96 pruebas REF 425-2040
IgA MPLT Microplaca de IgA aCL	425-2041	96 micropocillos divisibles recubiertos con cardiolipina estabilizada de corazón bovino (difosfatidil glicerol), conservados herméticamente en bolsas de papel metalizado con cierre hermético y desecante.	12 x 8 pocillos
IgA CAL 1 IgA aCL Calibrador 1	425-2042	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades APL en la etiqueta del frasco. Nocivo*.	0,25 mL
IgA CAL 2 IgA aCL Calibrador 2	425-2043	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades APL en la etiqueta del frasco. Nocivo*.	0,25 mL
IgA CAL 3 IgA aCL Calibrador 3	425-2044	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades APL en la etiqueta del frasco. Nocivo*.	0,25 mL
IgA CONTROL + IgA aCL Control positivo	425-2045	Suero humano. Consulte el rango esperado en unidades APL en la etiqueta del frasco. Nocivo*.	0,25 mL
IgA CONTROL - IgA aCL Control negativo	425-2046	Suero humano. Consulte el rango esperado en unidades APL en la etiqueta del frasco. Nocivo*.	0,25 mL
IgA CONJ Conjugado de IgA	425-2047	Solución de anticuerpos anti-IgA humana de cabra conjugados con HRP (naranja); albúmina bovina; contiene timerosal y sulfato de gentamicina al 0,01% como conservantes.	15 mL
SAMP DIL Diluyente para muestras	425-2008	Tampón fosfato salino (PBS) con azida sódica al 0,1% (solución verde). Contiene suero bovino. Nocivo*.	60 mL
SUBS Sustrato	425-2009	Tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H ₂ O ₂); preparada para su uso.	15 mL
STOP Solución de parada	425-2010	Ácido sulfúrico 0,36 N.	15 mL
WSH CONC Concentrado de lavado	425-2011	Tampón fosfato salino (PBS) 33X.	2 x 30 mL

* **PRECAUCIÓN:** Contiene ≤ 0,1% de azida sódica.

ELEMENTOS ADICIONALES NECESARIOS

Agua para reactivos para preparar solución de lavado PBS (2L)

Probeta graduada, 30 mL

Pipetas de precisión capaces de suministrar entre 5 y 1000 μ L, con puntas apropiadas

Instrumentos de cristal apropiados para la manipulación de volúmenes pequeños

Matraz o botella de 1L

Botellas de lavado, preferiblemente con la punta parcialmente cortada hacia atrás para permitir un flujo amplio, o un sistema de lavado semiautomatizado

Guantes desechables

Espectrómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con una referencia de 620 nm, si se dispone de ella)

Pipetas multicanal capaces de transferir líquidos a 8 pocillos simultáneamente

Cronómetro de cuenta atrás

Pehachímetro

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. Cualquier material de origen humano debe considerarse infeccioso y manipularse utilizando los procedimientos de bioseguridad habituales.
2. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulen las muestras de pacientes y los reactivos del kit.
3. No pipetee con la boca.
4. Utilice equipo de protección personal al manipular todos los reactivos y las muestras, y al emplear el lavador y el lector.
5. Deseche todos los residuos de acuerdo con las normativas nacionales y locales aplicables.
6. Algunos reactivos contienen azida sódica, que puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. Tenga cuidado al desechar estos reactivos. Si se desechan en un desagüe, deje correr una gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azidas.
7. El material de desecho que contenga muestras de pacientes o productos biológicos debe considerarse biopeligroso al desecharse o tratarse.
8. Los reactivos químicos deben manipularse según las prácticas correctas de laboratorio.
9. El apartado «*Información de seguridad del producto*» contiene más información de seguridad y advertencias sobre los peligros químicos.
10. Los líquidos derramados deben limpiarse bien inmediatamente. Desinfecte las zonas en las que se hayan derramado materiales biopeligrosos. Deseche apropiadamente todo el material contaminado.
11. No utilice el kit después de la fecha de caducidad. La fecha está impresa en las cajas del kit.
12. Este producto utiliza suero humano en la fabricación del calibrador y los controles. Todas las unidades se han analizado con métodos aceptados por la FDA, y se ha comprobado que no son reactivas a los virus VIH-1 y VIH-2, ni a los virus de la hepatitis B (VHB), la hepatitis C (VHC) y la sífilis. Ningún método analítico puede garantizar con toda seguridad la ausencia de éstos y de otros agentes infecciosos en productos que contengan material

- de origen humano. De acuerdo con las prácticas correctas de laboratorio, todo el material de origen humano debe considerarse potencialmente infeccioso de todos los agentes infecciosos; por lo tanto, manipule el calibrador y los controles con las mismas precauciones empleadas con las muestras de pacientes.
13. Para asegurar el funcionamiento correcto de este producto, es necesario seguir el protocolo especificado en estas instrucciones.
 14. Nunca mezcle el contenido de diferentes frascos del mismo reactivo, ya que el reactivo podría resultar contaminado y comprometer el funcionamiento del producto.
 15. Unos 30 minutos antes de comenzar el análisis, extraiga el kit de la cámara de refrigeración (entre 2 y 8 °C) y permita que los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C). Antes de utilizar los reactivos, mézclelos bien girando suavemente el recipiente varias veces. Después de utilizar el material, consérvelo a entre 2 y 8 °C.
 16. No intercambie reactivos entre lotes del kit.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Lleve las muestras de suero y los reactivos del kit a la temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C) y mézclelos bien antes de utilizarlos; evite la formación de espuma. Vuelva a guardar todas las muestras y reactivos no utilizados en un almacenamiento refrigerado tan pronto como sea posible.
2. Todas las diluciones de calibradores, controles y sueros de prueba deben hacerse justo antes de utilizarlas en el análisis.
3. El lector de placas debe programarse a cero utilizando un pocillo blanco con aire.
4. Para obtener un rendimiento óptimo del análisis, es esencial una buena técnica de lavado. La mejor forma de conseguir un lavado adecuado consiste en dirigir al fondo de los micropocillos un chorro a presión de solución de lavado apretando una botella de plástico de punta grande. La solución de lavado que haya en el pocillo blanco con aire no interferirá en el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automatizado para placas de microvaloración.
5. **¡IMPORTANTE!** Si no se elimina bien los restos de PBS, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Cuando sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de transferir líquidos a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y ofrece una incubación y unos tiempos de reacción más uniformes en todos los pocillos.
7. Es esencial que todos los pasos se realicen a su debido tiempo. Todos los calibradores, los controles y las muestras deben añadirse en un período de cinco minutos. El tamaño de los lotes de muestras no debe ser superior a la cantidad que pueda añadirse en dicho período de tiempo.
8. En todas las incubaciones, el período de incubación empieza al terminar de añadir los reactivos o las muestras. Se recomiendan períodos de incubación de 30 minutos, aunque con este formato pueden utilizarse períodos de incubación de hasta 40 minutos.

9. La adición de todas las muestras y los reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden producir resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir los frascos primarios y durante la extracción.
12. **No utilice Tween 20 ni otros detergentes en este análisis, ya que la presencia de restos de dichas sustancias puede afectar negativamente a la precisión del análisis.**
13. No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tipo de muestra

La matriz de muestras preferida es el suero, aunque también puede utilizarse plasma (consulte el apartado «Muestras de plasma», más abajo).

Precaución en la recogida de muestras

Cualquier material de origen humano debe considerarse infeccioso y manipularse utilizando los procedimientos de bioseguridad habituales.

Aditivos y conservantes de las muestras

El plasma puede recogerse con la mayoría de los anticoagulantes, **excepto heparina**.

Tratamiento previo y almacenamiento de las muestras

Muestras de suero: La sangre debe recogerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación después de la formación de coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2 y 8 °C. Si las muestras tienen que almacenarse durante más de 72 horas, deberán congelarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evite las congelaciones y descongelaciones repetidas.

Muestras de plasma: Si el análisis se realiza inmediatamente, puede utilizarse plasma recogido con la mayoría de los anticoagulantes, **excepto heparina**. La sangre debe recogerse mediante venopunción, y el plasma debe separarse de las células mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante debe retirarse con cuidado después de la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas; puede ser conveniente repetir los pasos de centrifugación y separación para reducir al mínimo la contaminación con plaquetas. Las plaquetas descompuestas o envejecidas pueden reaccionar con los anticuerpos antifosfolípidos, lo que produciría resultados aberrantes (riesgo de obtener resultados falsos negativos).

PRECAUCIÓN: No utilice suero ni plasma hemolizados, ictericos o lipémicos, ya que podrían obtenerse resultados aberrantes. Las muestras que contengan partículas visibles deben clarificarse mediante centrifugación antes de analizarlas.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del kit deben conservarse a entre 2 y 8 °C, y pueden emplearse hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. **No la congele.**

- Recoja todos los reactivos, las muestras y las diluciones necesarios antes de comenzar el análisis.
- Asigne y registre los pocillos de los controles y las muestras.

Solución de lavado

Mida 30 mL de concentrado de lavado (PBS 33X) y dilúyalo con agua para reactivos hasta obtener 1 litro. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Tape y almacene la solución de lavado no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de crecimiento microbiano, contaminación cruzada o decoloración.

Microplaca de IgA aCL

1. Preparados para su uso.
2. Tras abrir la bolsa, los pocillos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se vuelven a introducir inmediatamente en la bolsa de papel metalizado con desecante y ésta se vuelve a cerrar herméticamente y se almacena a entre 2 y 8 °C.
3. Guarde la gradilla para utilizarla en el futuro.

Diluyente para muestras

1. Preparados para su uso.
2. Deje que el diluyente para muestras alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
3. Mézclelo bien.
4. Evite la contaminación innecesaria.

Conjugado, sustrato y solución de parada

- Preparados para su uso.

Soluciones de trabajo 1:50

Prepárelas de la forma siguiente:

1. Diluya 10 µL de muestra de paciente en 490 µL de diluyente para muestras.
2. Diluya 10 µL de cada calibrador de IgA aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
3. Diluya 10 µL de control positivo de IgA aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
4. Diluya 10 µL de control negativo de IgA aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
5. Deseche las soluciones de trabajo restantes después del uso.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

No utilice reactivos que muestren señales de fugas.

Deseche la solución de lavado si muestra signos de crecimiento microbiano, contaminación cruzada o decoloración.

PROCEDIMIENTO

Pasos del análisis

1. El análisis puede realizarse con una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3, más diluyente para muestras/blanco de reactivo como calibrador 4 equivalente a 0 unidades APL) o con una calibración de un punto (calibrador 3). Analice por duplicado los calibradores y los controles. Tanto con el método de varios puntos como con el de un solo punto debe procesarse un control blanco de reactivo; para lo que debe añadirse al pocillo diluyente para muestras sin suero. Este pocillo se tratará igual que los controles y las muestras de pacientes en pasos posteriores del análisis.

2. Retire de la gradilla todas las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar. Almacénelas con el desecante en la bolsa de cierre hermético suministrada.
3. Añada 100 µL de calibradores diluidos (incluido el blanco de reactivo/calibrador 4), controles y muestras de pacientes a los pocillos apropiados.
4. Incube de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente. Tras finalizar la incubación, invierta con cuidado los micropocillos y retire el líquido de las muestras. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
5. Lave **5** veces con solución de lavado. Durante cada lavado, todos los pocillos deben llenarse con solución de lavado. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciarlos de líquido. Utilice un movimiento brusco de la muñeca para expulsar el líquido de los pocillos. La gradilla debe apretarse por las partes centrales inferior y superior para retener los módulos de micropocillos durante el lavado. Utilice papel absorbente para retirar el líquido de lavado residual. No permita que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
6. Añada 100 µL de solución de anticuerpos anti-IgA humana conjugados con HRP (naranja) a los pocillos correspondientes al calibrador IgA, los controles, el blanco de reactivo y las muestras de pacientes.
7. Incube entre 30 y 40 minutos a temperatura ambiente. Tras finalizar la incubación, invierta con cuidado los micropocillos y retire la solución de conjugado.
8. Lave **5** veces con solución de lavado, como en el paso 5. Utilice un movimiento brusco para expulsar el líquido y utilice papel absorbente para secar los micropocillos después del lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
9. Añada 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo e incube de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente. Añada sustrato a los pocillos a una velocidad constante. En los pocillos con muestras positivas se desarrollará un color azul.
10. Añada 100 µL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir solución de parada a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se añadió el sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y la solución incolora permanecerá incolora. Lea la DO de cada pocillo a 450 nm. Los valores de DO deben medirse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Requisitos del control de calidad

Cada vez que se realice la prueba deberán incluirse un calibrador de IgA aCL, un control positivo de IgA aCL, un control negativo de IgA aCL y diluyente para muestras/blanco de reactivo.

PAUTAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Control de calidad:

Para que una prueba sea válida, deben cumplirse todos los siguientes criterios:

1. La DO media del calibrador 3 debe ser al menos 0,400 para asegurar que el kit está funcionando correctamente. Las lecturas de DO del calibrador 3 inferiores a 0,400 pueden indicar que el kit ya no está en condiciones para seguir utilizándose.
2. La DO media del calibrador 4 o el blanco de reactivo debe ser inferior a 0,100. Las lecturas superiores a 0,100 pueden indicar una posible contaminación del reactivo o un lavado inadecuado de las placas.

3. Los valores medios de laboratorio de los controles de anticuerpos anticardiolipina deben estar dentro del rango aceptable correspondiente indicado en las etiquetas de los recipientes. Pequeñas desviaciones ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Los valores de DO de los duplicados de los controles o de las muestras de pacientes deben estar a menos de un 20% del valor medio de la DO en las muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios valores discriminadores normales para la población adecuada de pacientes. Como ejemplo, consulte el apartado «Especificidad», dentro de «Características de rendimiento».

Si no se cumple alguno de estos criterios, los resultados no serán válidos y deberá repetirse la prueba.

Cálculo de los resultados:

Calibración de un punto

1. Calcule las DO medias de los duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Divida el valor de la concentración del calibrador 3 (indicado en la etiqueta del frasco) por la DO media de los duplicados del calibrador 3 para obtener el factor de conversión.
3. Multiplique la DO media de cada uno de los controles y las muestras de pacientes por el factor de conversión para obtener un valor de concentración en unidades APL.

$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Concentración de anticuerpos IgA anticardiolipina del calibrador 3 (APL)}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 3 (DO)}}$$

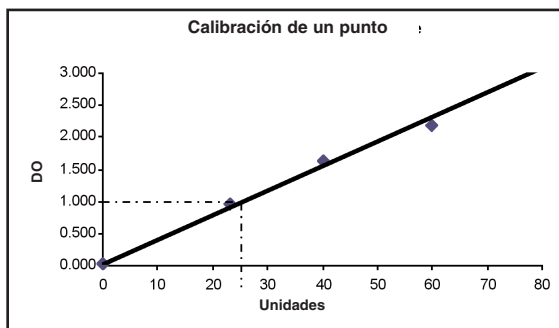
La concentración de anticuerpos anticardiolipina de la muestra = Factor de conversión X Absorbancia de la muestra (DO)

4. El factor de conversión debe calcularse para cada tanda analítica. Si se utiliza un factor de conversión de otro análisis, los resultados no serán válidos.
5. Las muestras con valores de anticuerpos anticardiolipina superiores a 80 APL pueden clasificarse como «superiores a 80 APL», o pueden diluirse con diluyente para muestras y volverse a analizar para obtener una estimación más precisa de la concentración de anticuerpos anticardiolipina. Los resultados del segundo análisis de estas muestras deben multiplicarse por el factor de dilución para obtener el valor final de anticuerpos anticardiolipina.
6. Asegúrese de que se han cumplido todos los parámetros de control de calidad (consulte el apartado «Control de calidad») antes de comunicar los resultados de la prueba.

Calibración con curva de varios puntos

1. Calcule las DO medias de los duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión lineal con los valores de los cuatro calibradores (consulte la concentración en unidades APL indicada en las etiquetas de los frascos; el calibrador 4 [diluyente para muestras] es igual a 0 APL) respecto a las DO medias de cada calibrador.

3. La curva de los calibradores puede trazarse automáticamente mediante un programa informático validado, o manualmente en papel milimetrado. Al generar la línea de regresión, se recomienda utilizar una intersección de cero para evitar los valores negativos. Si no se dispone de esta opción, todos los valores negativos se considerarán iguales a cero. Al generar la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados con una intersección de cero.
4. Determine los valores de los controles y las muestras de pacientes a partir de la curva de calibración.



Utilizando la curva de calibración de ejemplo suministrada, a una muestra con una DO de 1,000 a 450 nm le correspondería un valor calculado de 26,2 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo, y no debe utilizarse para calcular resultados de pacientes. En cada tanda analítica deberá generarse una nueva curva de calibración.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Aún se está investigando la importancia clínica de las concentraciones altas de anticuerpos anticardiolipina en otros estados patológicos aparte del LED. En estudios publicados, la prevalencia declarada de anticuerpos IgA aCL detectados en enfermos de LED varió en hasta un 44%^{12,17}.

Cuando se encuentre una concentración normal de anticuerpos anticardiolipina en presencia de manifestaciones clínicas, deberá realizarse la prueba de anticoagulación del lupus²⁰. El diagnóstico no puede establecerse solamente sobre la base de resultados positivos en anticardiolipina. Estos resultados deben interpretarse junto con el historial del paciente, los síntomas clínicos y los datos obtenidos en la exploración física y en otros procedimientos diagnósticos. El tratamiento de pacientes no debe iniciarse solamente sobre la base de un resultado positivo en anticuerpos anticardiolipina. Antes de iniciar el tratamiento será necesario considerar otros datos confirmatorios tales como indicaciones clínicas, otros resultados analíticos y la impresión del médico.

Un alto porcentaje de pacientes de sífilis seropositiva o activa confirmada tendrá concentraciones altas de anticuerpos anticardiolipina. En las personas que hayan dado positivo en anticuerpos anticardiolipina deberán realizarse procedimientos confirmatorios para descartar la sífilis. Los anticuerpos anticardiolipina pueden aparecer temporalmente durante muchas infecciones. Si un paciente da positivo en una primera prueba de anticuerpos anticardiolipina mientras hay signos clínicos de infección, las pruebas deberán repetirse después de un período apropiado²¹.

RANGO DE VALORES ESPERADOS

Tras analizar muestras de suero de 121 donantes de sangre sanos, se estableció el siguiente rango normal (media + 3 DE):

- < 22 APL

Prevalencia esperada

LED:

Se utilizó el kit para analizar 144 muestras de suero de personas con LED. Treinta y siete de las muestras (26%) dieron positivo en anticuerpos IgA anticardiolipina. No se encontró ninguna relación entre las concentraciones de anticuerpos anticardiolipina y las de anticuerpos anti-ADNbc o la actividad de la enfermedad. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-ADNbc y anti-ADNmc no reaccionan con los micropocillos recubiertos de cardiolipina del análisis.

Otros estados patológicos:

Se utilizó la prueba para analizar dieciocho muestras de suero de personas con osteoartritis (OA). Ninguna de las muestras dio positivo en anticuerpos IgA aCL.

Se utilizó la prueba para analizar noventa y dos muestras de suero de personas con esclerosis múltiple progresiva (EMP). Veintisiete de las muestras (29%) dieron positivo en IgA aCL.

Aún se está investigando la importancia clínica de los resultados positivos en otros estados patológicos aparte del LED.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad

Muestras normales:

Se analizaron muestras de suero de 121 donantes de sangre sanos en tres ocasiones diferentes para comprobar la presencia de anticuerpos IgA aCL. El valor discriminador normal calculado fue la concentración media de anticuerpos en unidades APL más tres desviaciones estándar. El valor calculado es 22 APL. Utilizando este valor discriminador, el análisis es específico en un 95% para los anticuerpos IgA.

Controles patológicos:

Se utilizó la prueba para analizar muestras de suero de 14 personas con LED o un trastorno seudolúpico, sin antecedentes de trombosis ni otras características del síndrome antifosfolípido. Una muestra dio positivo en anticuerpos IgA aCL. La especificidad global del análisis en esta población de muestras fue del 93%.

Sensibilidad

Se utilizó la prueba para analizar muestras de suero de 19 personas con LED o un trastorno seudolúpico, de las que se sabía que habían tenido al menos un episodio trombótico. Quince de las muestras dieron positivo en anticuerpos IgA aCL, lo que arroja una sensibilidad de un 79% en esta población de muestras.

Precisión

Se analizaron dos muestras con valores APL conocidos (uno bajo y otro alto) en 28 repeticiones en 3 ocasiones diferentes. Los coeficientes de variación (CV) intraanálisis e interanálisis se presentan en la tabla siguiente. El coeficiente de variación intraanálisis indicado es la media de los tres CV intraanálisis.

Muestra (conc. de aCL)	CV intraanálisis	CV interanálisis
Baja (16,0 APL)	4,2%	11,3%
Alta (33,0 APL)	8,7%	10,7%

Recuperación

Dos muestras con valores de concentración APL conocidos (uno bajo, LS, y uno alto, HS) se diluyeron a una proporción 1:1 con estándares que contenían cantidades conocidas de anticuerpos IgA anticardiolipina. Los valores calculados, observados y de recuperación se presentan en la tabla siguiente. Los valores de concentración de anticuerpos anticardiolipina se indican en unidades APL.

<u>Concentración APL</u>			
<u>Muestra</u>	<u>Calculada</u>	<u>Observada</u>	<u>Recuperación</u>
LS	--	3,1	--
LS + 4,4	3,8	4,9	130%
LS + 8,7	5,9	7,2	122%
LS + 17,5	10,3	13,5	131%
LS + 34,9	19,0	18,0	95%
HS	--	34,0	--
HS + 4,4	19,2	24,5	127%
HS + 8,7	21,4	24,8	116%
HS + 17,5	25,8	27,7	108%
HS + 34,9	34,5	32,4	94%

INFORMACIÓN DE SEGURIDAD DEL PRODUCTO

Diluyente para muestras, calibradores de IgA 1-3, control positivo de IgA y control negativo de IgA: R22, S36



Nocivo

R22 Nocivo por ingestión.
S36 Úsese indumentaria protectora adecuada.

Conjugado de IgA anticardiolipina

Advertencia: Este producto contiene sustancias químicas que el estado de California sabe causantes de defectos de nacimiento u otros daños relacionados con la reproducción. Contiene sulfato de gentamicina y timerosal al < 0,1%.

BIBLIOGRAFIA

1. Harris, E. N.; Gharavi, A. E.; Hughes, G. R. V. Anti-Phospholipid Antibodies. *Clin. Rheum. Dis.* **1985**, *11* (3), 591.
2. Gharavi, A. E.; Harris, E. N.; Asherson, R. A.; Hughes, G. R. V. Anti-Cardiolipin Antibodies: Isotype Distribution and Phospholipid Specificity. *Ann. Rheum. Dis.* **1987**, *46*, 1.
3. Espinoza, L. R.; Hartman, R. C. Significance of the Lupus Anticoagulant. *Am. J. Hematol.* **1986**, *22*, 331.
4. Elias, M.; Eldor, A. Thromboembolism in Patients with the "Lupus"-Type Circulating Anticoagulant. *Arch. Intern. Med.* **1984**, *144*, 510.
5. Fields, R. A.; Toubbeh, H.; Searles, R. P.; Bankhurst, A. D. The Prevalence of Anti-Cardiolipin Antibodies in a Healthy Elderly Population and Its Association with Antinuclear Antibodies. *J. Rheumatol* **1989**, *16*, 623.
6. Buchanan, R. R. C.; Wardlaw, J. R.; Riglar, A. G.; Littlejohn, G. O. Miller, M. H. Anti-Phospholipid Antibodies in Connective Tissue Diseases: Their Relation to the Anti-phospholipid Syndrome and Forme Fruste Disease. *J. Rheumatol.* **1989**, *16*, 757.
7. Hughes, G. R. V.; Harris, E. N.; Gharavi, A. E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheumatol.* **1986**, *13* (3), 486.
8. Asherson, R. A.; Harris, E. N. Anticardiolipin Antibodies-Clinical Associations. *Postgrad. Med. J.* **1986**, *62*, 1081.
9. Asherson, R. A. Antibodies to Phospholipid and the "Anti-Phospholipid Syndrome." *Immunology Updates* **1989**, *1* (2), 1.
10. Harris, E. N.; Gharavi, A. E.; Boey, M. L.; Patel, B. M.; Mackworth-Young, C. G.; Loizou, S.; Hughes, G. R. V. Anti-cardiolipin Antibodies: Detection by Radioimmunoassay and Association with Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Lancet* **1983**, *ii*, 1211.
11. Harris, E. N. A Reassessment of the Antiphospholipid Syndrome. *J. Rheumatol.* **1990**, *17*, 733.
12. McNeil, H. P.; Chesterman, C. N.; Krilis, S. A. Immunology and Clinical Importance of Antiphospholipid Antibodies. *Adv. Immunol.* **1991**, *49*, 193.
13. Lopez, L. R.; Peterson, T. R.; Sauer, N. K.; Hites, M. J.; Collier, D. H.; Ensenhuer, R. J. Prevalence of Antibodies to Cardiolipin in Rheumatic Diseases Detected by a Standard Enzyme Immunoassay. *Clin. Exp. Rheumatol.* **1990**, *8*, 215.
14. Lopez, L. R.; Hites, M. J.; Loker, J. Association of Anti-Cardiolipin Antibodies with Thrombosis, Thrombocytopenia and Recurrent Abortion in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Thromb. Haemost.* **1991**, *65*, 1004.
15. Mahmood, T.; Racis, S. P.; Krey, P. R. IgA Anti-Cardiolipin Antibody (aCLA) in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum.* **1990**, *33*, R45.
16. Kalunian, K. C.; Peter, J. B.; Middlekauff, H. R.; Sayre, J.; Ando, D. G.; Mangotich, M.; Hahn, B. H. Clinical Significance of a Single Test for Anti-Cardiolipin Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Am. J. Med.* **1988**, *85*, 602-608.
17. Weidmann, C. E.; Wallace, D. J.; Peter, J. B.; Knight, P. J.; Bear, M. B.; Klinenberg, J. R. Studies of IgG, IgM and IgA Antiphospholipid Antibody Isotypes in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol.* **1988**, *15*, 74-79.
18. Santos, M. E.; Adams, J. L.; LaRosa, F. G.; Lopez, L. R. IgA Anti-Cardiolipin Antibodies in SLE Patients: Clinical Correlation with Thrombosis, Thrombocytopenia and Recurrent Abortion. *Arthritis Rheum.* **1991**, *34*, S129.

19. Triplett, D. A.; Brandt, J. T.; Kaczor, D.; Schaeffer, J. Laboratory Diagnosis of Lupus Inhibitors: A Comparison of the Tissue Thromboplastin Inhibition Procedure with a New Platelet Neutralization Procedure. *Am. J. Clin. Pathol.* **1983**, *79*, 678.
20. Harris, E. N. Solid Phase Anti-Cardiolipin Test Revisited. *Am. J. Med.* **1988**, *85*, 599.
21. Moore, J. E.; Mohr, C. F. Biologically False Positive Serologic Tests for Syphilis: Type, Incidence and Cause. *JAMA* **1952**, *150* (5), 467.

Contactos para obtener información técnica

Bio-Rad ofrece una línea telefónica gratuita de asistencia técnica, disponible 24 horas al día, 7 días a la semana. En Estados Unidos y Puerto Rico, llame al número gratuito 1-800-2BIORAD (224-6723).

Fuera de EE.UU., póngase en contacto con la oficina regional de Bio-Rad si necesita ayuda.

BIO-RAD

Bio-Rad
Laboratories

Clinical Diagnostics Group

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94544/
Telephone (510) 724-7000/
FAX (510) 741-5824
www.bio-rad.com/diagnostics

AUSTRALIA	Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Unit 1 Block Y, 391 Park Road, Regents Park NSW 2143 Phone 61-2-3914-2800 • Telefax 61-2-3914-2808
AUSTRIA	Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna Phone 43-1-877-6901 • Telefax 43-1-876-5079
BELGIUM	Bio-Rad S.A., N.V. Bogastraat 3, B-9810 Nazareth, Eve Phone 32-9-385-5511 • Telefax 32-9-385-6554
BRAZIL	Bio-Rad do Brasil, Rua dos Invalidos 717, 5 Andar, Lapa CEP 20731-070, Rio de Janeiro Phone 55-21-3151-8202 • Telefax 55-21-2221-6521
CANADA	Bio-Rad Laboratories, Ltd., 2403 Guénette Montreal, Quebec H4T 2E9 Phone 1-514-334-4372 • Telefax 1-514-334-4415
CZECH REPUBLIC	Bio-Rad spol. s r.o., Nad osivovam 1119/1, 141 00 Prague 4 Phone 420-2-41430592 • Telefax 420-2-41421642
CHINA	Bio-Rad China Limited, 18/F/D Hui Li Building, No. 88 Da Pu Road, Shanghai 200023 Phone 86-21-63032253 • Telefax 86-21-63961175
DENMARK	Bio-Rad Laboratories, Generatortvej 8 C, 2720 Herlev Phone 45-4457-1000 • Telefax 45-4459-1001
FINLAND	Bio-Rad Laboratories, Pihlajama 1 A, FIN-02240 Espoo Phone 358-9-804-22-00 • Telefax 358-9-804-11-10
FRANCE	Bio-Rad S.A., 3 boulevard Raymond Poincaré 97450 Marnes-la-Cochette Phone 33-1-4795-8003 • Telefax 33-1-47-41-8133
GERMANY	Bio-Rad Laboratories GmbH, Holoanmannstrasse 164, D-80389 Munich Phone 49-89-318840 • Telefax 49-89-318-84100
HONG KONG	Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F, DCH Commercial Centre, 23 Westlands Road, Quarry Bay Phone 852-2789-8000 • Telefax 852-2789-1257
INDIA	Bio-Rad Laboratories (India) Private Ltd., RBPL, Pkay Towers, Vaniya Nikunj, Udhyog Vihar, Phase-V, Gurgaon, 122016 Haryana Phone 91-124-8508112 • Telefax 91-124-6385114
ISRAEL	Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75655 Phone 972-3-9514127 • Telefax 972-3-9514129
ITALY	Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cefalù 18/A, 20190 Sesto San Giovanni, Milan Phone 39-02-219091 • Telefax 39-02-21609-038
JAPAN	Nippon Bio-Rad Laboratories, 7-18, Higashi-Nippori 5-chome, Arikawa-ku, Tokyo 110-0014 Phone 81-3-58114929 • Telefax 81-3-58114928
KOREA	Bio-Rad Korea Ltd., B1, Cambridge Building, 1461-15, Seocho-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-070 Phone 82-2-3473-4460 • Telefax 82-2-3472-7003
LATIN AMERICA	Bio-Rad Latin America, 1411N Palmita Freeway Blvd, Suite 101, Miami Lakes, Florida 33016 Phone 305-894-5350 • Telefax 305-804-5960
MEXICO	Bio-Rad Laboratories Mexico, S.A. de C.V., Adolfo Prieto No 1633, Colonia Del Valle, 03100 Mexico, D.F. Phone 5255-5531-2552 • Telefax 5255-552-5555
THE NETHERLANDS	Bio-Rad Laboratories DV, Tolkersvaart 10, 3005 KV Veenendaal Phone 31-318-540600 • Telefax 31-318-542216
NEW ZEALAND	Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road, Albany, Auckland Phone 64-9-415-2280 • Telefax 64-9-415-2284
NORWAY	Bio-Rad Laboratories, Johan Scharffenbergs vei 31, N-06394, Oslo Phone 47-22-38-11-30 • Telefax 47-22-38-11-39
POLAND	Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Nakowska Str. 3, C1-106 Warsaw Phone 48-22-3313999 • Telefax 48-22-3319988
PORTUGAL	Bio-Rad Laboratories, Rua do Empreendedor Industrial, 2-1º Esq., 2724 - 513, Amadora Phone 351 21 472 7700 • Telefax 351 21 472-7777
RUSSIA	Bio-Rad Laboratories Ltd., 37/A14 Leningradsky Pr., 125167 Moscow Phone 7-495-721-14-01 • Telefax 7-495-721-11-12
SINGAPORE	Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 27 International Business Park, #01-02, 600924 Phone 65-6514-3188 • Telefax 65-6415-3189
SOUTH AFRICA	Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bilton Road, Parkwood, Johannesburg 2193 Phone 27 11 442 05 38 • Telefax 27 11 442 05 25
SPAIN	Bio-Rad Laboratories S.A., Minicarc II, Edificio M, C/ Calendula 95, El Soto de la Muela 26109 Madrid Phone 34-91-594-5207 • Telefax 34-91-594-5211
SWEDEN	Bio-Rad Laboratories A.B., Vintergatan 1, Box 1037, S 172 22, Suncyberg Phone 46-8-555-127-00 • Telefax 46-8-555-127-80
SWITZERLAND	Bio-Rad Laboratories, Neuchâtelweg 2, CH-4153 Hebrard BL Phone 41-51-717-95-55 • Telefax 41-51-717-95-50
THAILAND	Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini Bldg., 239-2 Rajdamri Rd., Lumpini, Sathumwan, Bangkok 10330 Phone 662-457-4311 • Telefax 662-457-4312
UNITED KINGDOM	Bio-Rad Laboratories Ltd., Dio Rad House, Maylands Ave., Uxbridge/ Uxalstead, Uxbridge Middlesex Phone 44-208-328-2000 • Telefax 44-208-328-2350

Effective Date: Febrero 2006