



COD 44791 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-PR3 Sólo para uso "in vitro" en el laboratorio clínico

ANTICUERPOS ANTI-PR3

Enzimoimmunoanálisis
PRUEBA EN MICROPLACA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-proteína 3 (PR3) presentes en el suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuban con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con H₂O₂, 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 anti-PR3 en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto formado¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón Tris 2 mol/L, detergente no iónico 22 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4.
 - B. Diluyente de Muestra.** 125 mL. Tampón Tris 0,1 mol/L, cloruro de sodio 10 mmol/L, albúmina bovina 40 g/L, detergente no iónico 1,11 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4. Coloreado azul.
 - C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-PR3, azida de sodio 15 mmol/L.
 - C-. Control Negativo.** 2 mL. Suero humano negativo para anticuerpos anti-PR3, azida de sodio 15 mmol/L.
 - D. Conjugado.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa. Coloreado amarillo.
 - 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 proteína 3. Color marrón.
- S1-S6. Patrones Anti-PR3,** calibrados frente a un patrón de referencia interno. 1 mL, listos para su uso. Suero anti-PR3, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos anti-PR3 son 0, 5, 10, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta.

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. 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.

Antes del ensayo, diluir las muestras 1/100 en Diluyente de Muestra (B).

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 1).
3. **Determinación:**
 - **Cuantitativa:** Pipetear 100 µL de cada uno de los patrones (S1-S6), Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.
 - **Cualitativa:** Pipetear 100 µL de Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra (B) 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 µL de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 4 veces (Notas 2 y 3).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos como en el paso 4.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar las tiras durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 4).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón 0 U/mL (S1) o el blanco para el ajuste a 0. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinación cuantitativa. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Patrones frente a sus respectivas concentraciones de anticuerpos anti-PR3 (U/mL). La concentración de anticuerpos anti-PR3 en la muestra se calcula por interpolación 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 12 U/mL, o con razón de absorbancia superior a 1,1.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 8 U/mL, con razón de absorbancia inferior a 0,9.

Las muestras con concentraciones comprendidas entre 8 y 12 U/mL, o con razones comprendidas entre 0,9 y 1,1 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 valores de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El valor de absorbancia del blanco debe ser inferior a 0,4

La concentración del Control Positivo debe estar comprendida entre 40 y 60 U/mL y la del Control Negativo debe ser inferior a 8 U/mL.

La razón de absorbancia para el Control Positivo debe ser superior a 1,1 y para el Control Negativo debe ser inferior a 0,9.

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 (intraserie):

Concentración media	CV	n
1,8 U/mL	14,3 %	25
26,2 U/mL	6,9 %	25

– Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
1,8 U/mL	14,3 %	25
26,2 U/mL	14,7 %	25

– Límite de detección: 0,6 U/mL

– Intervalo de medida: 0,6 – 100 U/mL. 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 interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Existe una fuerte asociación entre la presencia en suero de anticuerpos anti-PR3 y la granulomatosis de Wegener. La especificidad para esta enfermedad es del 95-98%. La sensibilidad depende del estadio y actividad de la enfermedad, y se sitúa en torno al 90% para la granulomatosis de Wegener extendida (acompañada de glomerulonefritis necrosante, vasculitis sistémica e inflamación granulomatosa del tracto respiratorio), y en torno al 75% para la granulomatosis de Wegener limitada (sin implicaciones renales)^{3,4,5}.

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. En: 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. Savige J et al. International Consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Am J Clin Pathol 1999;111:507-513.
4. Kallenberg CGM. ANCA: their clinical relevance. En: van Venrooij WJ, Maini RN, editores, Autoantibody Manual C7.1, 1-12. Kluwer Academic Publishers 1996
5. Gross WL, Csernok E, Szymkowiak CH. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for proteinase 3. En: Peter JB and Shoenfeld Y, editores, Autoantibodies, Elsevier Science, 1996.