



COD 44867 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-fosfolípidos Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS IgG/IgM

Enzimoimmunoensayo
PRUEBA EN MICROPLACA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-fosfolípidos (APLA) presentes en el suero se unen a los antígenos adsorbidos a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuban con anticuerpos anti-IgG o IgM humanas conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido clorhídrico y la formación de producto amarillo se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón fosfatos, azida de sodio 15 mmol/L.
- B. Diluyente de Muestra.** 100 mL. Tampón Tris, azida de sodio 15 mmol/L.
- C+. Control Positivo IgG/IgM.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-fosfolípidos tipo IgG e IgM, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos anti-fosfolípidos, azida de sodio 15 mmol/L.
- DG. Conjugado IgG.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa.
- DM. Conjugado IgM.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgM humana conjugadas con peroxidasa.
- E. Sustrato.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido clorhídrico 1,0 mol/L.
- M. Microplaca:** 12 módulos de 8 pocillos cada uno sensibilizados con cardioplipina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, ácido fosfatídico y β₂-glicoproteína 1 altamente purificados.
- S1-S6. Patrones APLA IgG/IgM.** 1,5 mL, listos para su uso. Suero con anticuerpos anti-fosfolípidos IgG e IgM, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anti-fosfolípidos IgG son 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta. Las concentraciones de anti-fosfolípidos IgM son 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta. Calibrados frente al suero de referencia reconocido internacionalmente de E.N. Harris, Louisville.

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 del kit sin empezar, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso. Una vez abiertos, se recomienda utilizar los componentes antes de 4 semanas.

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 30 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. Diluir las muestras 1/100 con Diluyente de Muestra antes del ensayo. Utilizar siempre diluciones frescas.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
3. **Determinación cuantitativa:** Pipetear 100 µL de cada uno de los Patrones IgG/IgM (S1-S6), Control Positivo IgG/IgM (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.
Determinación cualitativa: Pipetear 100 µL de Patrón S3 IgG/IgM, Control Positivo IgG/IgM (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra 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 3 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado IgG (DG) o Conjugado IgM (DM) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (Nota 5).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón 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-fosfolípidos (IgG o IgM, en U/mL). La concentración de anticuerpos 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:

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} S3 \times F$$

El valor F es 0,8 tanto para IgG como para IgM, y relaciona S3 con el valor discriminante teórico de la prueba.

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 y repetir la operación.

VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con concentraciones superiores a 10 U/mL, o con razón de absorbancia superior a 1,0, tanto para IgG como para IgM.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 10 U/mL, o con razón de absorbancia inferior a 1,0, tanto para IgG como para IgM.

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 0,150, tanto para IgG como para IgM.

El valor de absorbancia del Patrón S6 debe ser superior a 1,300, tanto para IgG como para IgM.

La concentración del Control Positivo (C+) debe quedar comprendida entre 28 U/mL y 48 U/mL, y la del Control Negativo (C-) debe ser inferior a 10 U/mL, tanto para IgG como para IgM.

La razón de absorbancia para el Control Negativo (C-) debe ser inferior a 1,0, tanto para IgG como para IgM.

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):

anti-fosfolípidos (IgG)		
U/mL	CV %	n
25,4	6,4	24
59,2	4,8	24
89,3	3,1	24

anti-fosfolípidos (IgM)		
U/mL	CV%	n
9,4	4,2	24
34,1	5,8	24
78,1	6,3	24

– Reproducibilidad (inter):

anti-fosfolípidos (IgG)		
U/mL	CV %	n
34,4	2,8	30
78,8	4,5	30
96,7	5,1	30

anti-fosfolípidos (IgM)		
U/mL	CV%	n
22,1	4,6	30
94,5	3,2	30
78,3	3,1	30

- Límite de Detección: 0,5 U/mL, tanto para IgG como para IgM.
- El kit Anti-Fosfolípidos IgG/IgM reconoce solamente autoanticuerpos específicos de fosfolípidos. No se han observado reacciones cruzadas con anticuerpos anti-dsDNA y anticuerpos presentes en sífilis.
- Interferencias: La hemólisis (hemoglobina < 1000 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 3000 mg/dL) y la bilirrubina (< 40 mg/dL) no interfieren. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².
- Intervalo de medida: 1,5–100 U/mL, tanto para IgG como para IgM. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra y repetir la medición.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La detección de anticuerpos anti-fosfolípidos dirigidos contra distintos fosfolípidos cargados negativamente³ en plasma o suero humano se utiliza para el diagnóstico del síndrome antifosfolípidos. Este síndrome se caracteriza por un incremento del riesgo de trombosis, trombocitopenia y pérdida fetal en ocasiones asociado a enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades no autoinmunes⁴.

La sensibilidad y especificidad para el síndrome antifosfolípidos del kit de Anticuerpos Anti-Fosfolípidos IgG de BioSystems fue del 87,7% y 96,0%, respectivamente, en un estudio con 223 muestras clínicas. Para el isotipo IgM, la sensibilidad fue del 75,0% y la especificidad fue del 96,7%, en un estudio con 200 muestras clínicas. Los detalles de los estudios están disponibles bajo solicitud.

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. No mezclar componentes de distintos lotes de kit.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
3. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
4. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
5. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear 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. Riley RS, Friedline J, Rogers JS 2nd. Antiphospholipid antibodies: standardization and testing. Clin Lab Med 1997; 17: 395-430.
4. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. Lancet 1993; 342:341-344.