



COD 44871 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-M2 Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

**ANTICUERPOS ANTI-M2**Enzimoimmunoanálisis  
PRUEBA EN MICROPLACA**FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Los anticuerpos anti-M2 (subtipo mitocondrial M2) 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 sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 reacción<sup>1</sup>.

**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.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-M2, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos anti-M2, azida de sodio 15 mmol/L.
- D. Conjugado.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa.
- E. Sustrato.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido clorhídrico 1 mol/L.
- M. Microplaca:** 12 módulos de 8 pocillos cada uno sensibilizados con antígeno del subtipo mitocondrial M2 altamente purificado
- S1-S6. Patrones.** 1,5 mL listos para su uso. Suero con anticuerpos anti-M2, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos son 0, 12,5, 25, 50, 100 y 200 UI/mL, según se indica en la etiqueta. Calibrados frente a la Preparación de Referencia de la OMS 67/183 a 100 UI/mL.

*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 (S1-S6), Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.  
**Determinación cualitativa:** Pipetear 100 µL de Patrón S3, Control Positivo (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 (D) 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-M2 (UI/mL). La concentración de anticuerpos en la muestra se calcula por interpolación en la curva de calibración.

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

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

El valor F es 0,8 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 UI/mL o con razón de absorbancia superior a 1,0.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 10 UI/mL o con razón de absorbancia inferior a 1,0.

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.

El valor de absorbancia del Patrón S6 debe ser superior a 1,300.

La concentración del Control Positivo debe quedar comprendida entre 55 UI/mL y 85 UI/mL, y la del Control Negativo debe ser inferior a 10 UI/mL.

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

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):

UI/mL	CV %	n
39,8	7,0	24
81,3	3,8	24
177,3	3,6	24

– Reproducibilidad (interserie):

UI/mL	CV %	n
40,1	6,2	30
84,6	11,8	30
180,4	3,8	30

– Límite de detección: 1,0 UI/mL

– El kit Anti-M2 reconoce solamente anticuerpos específicos de las proteínas del complejo  $\alpha$ -ceto ácido deshidrogenasa. No se han observado reacciones cruzadas con otros autoantígenos mitocondriales.

- 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 interferir<sup>2</sup>.
- Intervalo de medida: 3,0–200 UI/mL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra y repetir la medición.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los anticuerpos anti-mitocondriales están fuertemente asociados con la cirrosis biliar primaria y se hallan presentes en el suero de aproximadamente el 90-95% de los pacientes. Hasta la fecha se han descrito nueve subtipos de anticuerpos mitocondriales, aunque solamente cuatro guardan relación con la cirrosis biliar primaria: M2, M4, M8 y M9. Sin embargo, está bien establecido que sólo los anticuerpos anti-M2 son específicos de cirrosis biliar primaria. Estos anticuerpos pueden ser detectados años, incluso décadas, antes de la aparición síntomas clínicos e histológicos. Para el diagnóstico diferencial de cirrosis biliar primaria, se recomienda la determinación de anticuerpos anti-M2 mediante ELISA por su elevada sensibilidad y especificidad<sup>3,4,5,6</sup>.

La sensibilidad y especificidad para la cirrosis biliar primaria del kit de Anticuerpos Anti-M2 de BioSystems fue del 97,2% y 94,2%, respectivamente, en un estudio con 470 muestras clínicas. Los detalles del estudio 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. Tanaka A, Miyakawa H, Luketic VA, Kaplan M, Storch WB, Gershwin ME. The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. Cell Mol Biol 2002;48(3):295-9.
4. Berg PA, Klein R. Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies. Sem Liver Dis 1989; 9: 103-116.
5. Baum H, Palmer C. The PBC specific antigen. Mol Aspects Med 1985; 8: 201-234.
6. Fussey SPM, Guest JR, James OFW, Bassendine MF, Yeanman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8654-8658.