


Kit para ELISA rápido de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina - Instrucciones de uso
RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff

CF14 5DU, Reino Unido

Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

 Correo electrónico: info@rsrltd.com

 Sitio web: www.rsrltd.com

 Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

USO PREVISTO

El kit para ELISA rápido de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina (AChRab) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina en suero humano.

Los autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina (AChR) son responsables de los defectos de la unión neuromuscular en la miastenia grave, por lo que la determinación de estos anticuerpos puede resultar muy útil en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.

REFERENCIAS

 R. Hewer *et al.*

A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies

Clinica Chimica Acta 2006 **364**: 159-166

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo ELISA rápido para la determinación de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina de RSR depende de la capacidad de los autoanticuerpos anti-AChR en el suero humano para unirse a sitios del receptor de acetilcolina similares a los que se unen diversos anticuerpos monoclonales (MAb) como MAb1 (que recubre los pocillos de la placa de ELISA) y/o MAb2 y/o MAb3 (que están marcados con biotina). En ausencia de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina, se forma un complejo entre los MAb1 que recubren los pocillos de la placa, el AChR y los complejos MAb2-biotina y MAb3-biotina. A continuación, se detectan los complejos MAb2-biotina y MAb3-biotina unidos. Para ello, se añade estreptavidina-peroxidasa (SA-POD), que se une específicamente a la biotina. Luego se desecha el exceso de SA-POD que no se ha unido y se añade el sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que produce la aparición de un color azul. Esta reacción se detiene mediante la adición de una solución de parada, que hace que el contenido de los pocillos se vuelva de color amarillo. Por último, se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 450 nm mediante un lector de placas de ELISA. En presencia de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina, se inhibe la formación del complejo MAb1-AChR-MAb2-/MAb3-biotina, cuya consecuencia es una menor unión de SA-POD y una

reducción de la absorbancia final a 450 nm. Cuanto mayor sea la concentración de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina en el suero problema, mayor será la inhibición de la unión de MAb-biotina.

El ensayo del kit para ELISA rápido para la determinación de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina puede llevarse a cabo en un solo día, con un tiempo de incubación de 5 horas y sin refrigeración. Resulta especialmente adecuado para usuarios con analizadores automatizados de ELISA.

CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA DE SUERO

Los sueros a examinar deben analizarse poco después de su separación o conservarse, a ser posible en partes alícuotas, a una temperatura de -20 °C o inferior. La cantidad de 100 µl es suficiente para un ensayo (determinaciones de 50 µl por duplicado). Deben evitarse la congelación y descongelación repetidas, así como el aumento de la temperatura de conservación. No utilizar muestras de suero hemolizado o de aspecto lechoso por exceso de lípidos. Cuando se requiera, dejar que los sueros problema alcancen la temperatura ambiente y mezclar con cuidado para asegurar la homogeneidad. Centrifugar el suero antes del ensayo (preferiblemente durante 5 min a 10–15 000 r.p.m. en una microcentrífuga) para eliminar las partículas. No debe omitirse este paso de centrifugación en el caso de sueros turbios o con partículas.

SÍMBOLOS

| Símbolo | Significado |
|---------|---|
| | Declaración CE de conformidad |
| | Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> |
| | Número de catálogo |
| | Código de lote |
| | Consúltense las instrucciones de uso |
| | Fabricante |
| | Contenido suficiente para <n> utilizations |
| | Fecha de caducidad |
| | Limitación de temperatura |
| | Control negativo |
| | Control positivo |

MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Pipetas para dispensar 25 µl, 50 µl y 100 µl.

Pipeta de repetición de tipo Eppendorf.

Medios para medir distintos volúmenes para la reconstitución o dilución de los reactivos suministrados.

Tubos Eppendorf.

Agua pura.

Lector de placas de ELISA adecuado para formatos de 96 pocillos y que permita medir a 450 nm.
 Agitador de placas de ELISA con una velocidad de 500 agitaciones/min (que no sea un agitador orbital).
 Tapa para placas de ELISA.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

Conservar el kit sin abrir y todos los componentes (A–P) a una temperatura de 2–8 °C.

| | |
|------------|---|
| A | Pocillos recubiertos con MAb1 AChR 12 tiras rompibles de 8 pocillos cada una (96 en total) en un marco de soporte, dentro de una bolsa sellada de aluminio. Dejar reposar la bolsa de aluminio a temperatura ambiente (20–25 °C) durante 30 minutos antes de abrirla. |
| | Asegurarse de que las tiras están bien encajadas en el marco de soporte suministrado. Tras la apertura, volver a introducir las tiras de pocillos sin usar en la bolsa de aluminio original y sellar con cinta adhesiva. Colocar esta bolsa dentro de la bolsa de plástico de autocierre con desecante suministrada. Conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit. |
| B | AChR de tipo fetal 3 viales Liofilizado |
| | Reconstituir cada vial con 0,7 ml de tampón de reconstitución de AChR (D). Mezclar con cuidado y dejar reposar a temperatura ambiente (20–25 °C) durante 5 minutos antes de utilizarlo. Agrupar los viales cuando se requiera más de uno y utilizarlos inmediatamente para reconstituir el AChR de tipo adulto. |
| C | AChR de tipo adulto 3 viales Liofilizado |
| B+C | Reconstituir cada vial de C con 0,5 ml de AChR de tipo fetal (B) reconstituido para obtener una mezcla de AChR de tipo fetal y adulto (B+C). Mezclar con cuidado y dejar reposar a temperatura ambiente (20–25 °C) durante 5 minutos antes de utilizarlo. Agrupar los viales cuando se requiera más de uno. Utilizar durante un máximo de 6 horas tras la reconstitución si se conserva a 2–8 °C ¹ . |
| D | Tampón de reconstitución de AChR 5 ml Listo para usar |
| E | MAb AChR–biotina (MAb2+MAb3) 3 viales Liofilizado |
| | Reconstituir cada vial con el volumen de tampón de reconstitución de MAb-biotina (F) que se muestra en la etiqueta. Mezclar con cuidado y dejar reposar a temperatura ambiente (20–25 °C) durante 5 minutos antes de utilizarlo. Agrupar los viales cuando se requiera más de uno. Una vez |

| | |
|-------------|---|
| | reconstituido, conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit. |
| F | Tampón de reconstitución de MAb-biotina 15 ml Listo para usar |
| G | Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD) 0,7 ml Concentrada |
| | Diluir 1:20 con diluyente para SA-POD (H). Por ejemplo, 0,5 ml (G) + 9,5 ml (H). Conservar a 2–8 °C durante un máximo de 16 semanas tras la dilución. |
| H | Diluyente para SA-POD 15 ml Listo para usar |
| J | Sustrato de peroxidasa (TMB) 15 ml Listo para usar |
| K | Solución de parada 10 ml Lista para usar |
| L | Solución de lavado concentrada 100 ml Concentrada |
| | Diluir 10x con agua pura antes de usar. Por ejemplo, 100 ml (L) + 900 ml de agua pura. Una vez diluida, utilizar hasta la fecha de caducidad del kit. |
| M1–4 | Calibradores 0,5; 1,0; 6,5 y 20 nmol/l de toxina unida 4 × 0,7 ml Listos para usar |
| N | Control negativo 3 ml Listo para usar |
| P1–2 | Controles positivos I y II (ver la etiqueta para conocer el intervalo de concentración) 2 × 0,7 ml Listos para usar |

¹ La absorbancia a 450 nm será un 10–15 % inferior si los receptores reconstituidos se han conservado durante 6 horas a 2–8 °C.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Dejar reposar todos los reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de utilizarlos. Se recomienda utilizar una pipeta de repetición de tipo Eppendorf en los pasos 2, 5, 7, 9 y 10.

| | |
|----------|---|
| 1 | Pipetear 100 µl de muestras (calibradores [M1–4 - opcional], controles positivos [P1–2], control negativo [N] y sueros problema) en distintos tubos Eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados. |
| 2 | Pipetear 25 µl de mezcla de AChR de tipo fetal y adulto (B+C) en cada tubo Eppendorf (del paso 1) y tapar los tubos. Asegurarse de que todo el líquido quede |

| | |
|----|---|
| | en el fondo del tubo (en caso de duda, centrifugar los tubos en una microcentrífuga durante 10 segundos a 10–15 000 r.p.m.). Mezclar con cuidado en vórtex e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. |
| 3 | Mezclar con cuidado en vórtex cada tubo con mezcla de muestra-AChR del paso 2. Pipetear por duplicado 50 µl de cada mezcla de muestra-AChR en los pocillos recubiertos con MAb1 AChR (A), dejando 2 pocillos vacíos para los blancos. Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto). |
| 4 | Aspirar los pocillos con un lavador de placas o desecharlo invirtiendo rápidamente el marco de soporte de los pocillos encima de un recipiente adecuado. Lavar los pocillos tres veces con solución de lavado (L) diluida. En caso de lavado manual, golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente limpia y seca para eliminar el exceso de líquido de lavado. |
| 5 | Pipetear 50 µl de MAb AChR-biotina (E) reconstituido en cada pocillo (excepto los blancos). Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto). |
| 6 | Repetir el paso 4 de lavado. |
| 7 | Pipetear 100 µl de SA-POD (G) diluida en cada pocillo (excepto los blancos). Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto). |
| 8 | Repetir el paso 4 de lavado. En caso de lavado manual, lavar una vez más con agua pura para eliminar la espuma. Golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente limpia y seca para eliminar el exceso de líquido de lavado. |
| 9 | Pipetear 100 µl de TMB (J) en cada pocillo (incluidos los blancos). Tapar el marco de soporte e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitar. |
| 10 | Pipetear 50 µl de solución de parada (K) en cada pocillo (incluidos los blancos), tapar el marco de soporte y agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas. Hay que asegurarse de que las incubaciones con el sustrato sean las mismas para cada uno de los pocillos. |
| 11 | Al cabo de 30 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm con un lector de placas de ELISA, utilizando como blancos los pocillos que contienen únicamente 100 µl de TMB (J) y 50 µl de solución de |

| |
|-------------|
| parada (K). |
|-------------|

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

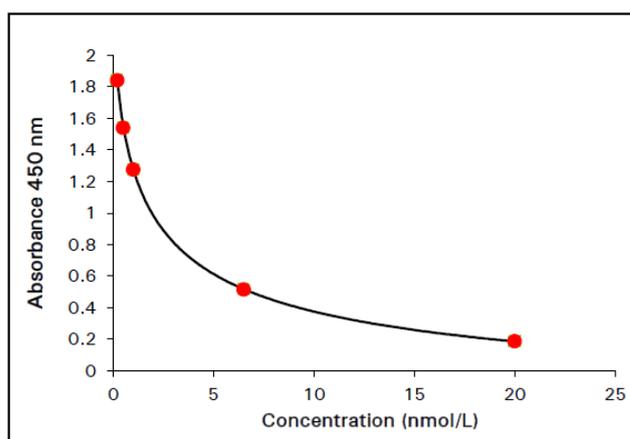
Se puede establecer una curva de calibración representando gráficamente la concentración de calibrador (incluido un valor de 0,2 nmol/l para el control negativo) en el eje de las abscisas (escala lineal) y la absorbancia de los calibradores en el eje de las ordenadas (escala lineal). A continuación, se puede leer la concentración de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina en los sueros de paciente a partir de la curva de calibración. Los datos en estas instrucciones se basan en un ajuste de curva de 4 parámetros. Las muestras con una concentración elevada de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina pueden diluirse con el control negativo (N). Por ejemplo, 10 µl de muestra más 90 µl de control negativo (N) para obtener una dilución 10x. Pueden prepararse otras diluciones (p. ej., 100x) a partir de la dilución 10x o de otra forma, según convenga. Algunos sueros no se diluirán de forma lineal, por lo que para el cálculo de la concentración de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina se recomienda utilizar la dilución con la que se obtenga el valor más cercano al 50 % de inhibición.

RESULTADOS TÍPICOS CON LA CURVA ESTÁNDAR

(a modo de ejemplo; no utilizar para calcular los resultados reales)

| Muestra | Abs. 450 nm | Conc. nmol/l |
|---------------------|-------------|------------------|
| Control negativo N | 1,842 | 0,2 ² |
| M1 | 1,540 | 0,5 |
| M2 | 1,276 | 1,0 |
| M3 | 0,516 | 6,5 |
| M4 | 0,187 | 20 |
| Control positivo P1 | 0,568 | 5,6 |
| Control positivo P2 | 1,132 | 1,4 |

² Ver *Análisis de los resultados* (más arriba).



Los resultados también se pueden expresar como inhibición (% Inh.) de la unión de AChR, calculada con la fórmula:

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbancia muestra problema a 450 nm}}{\text{absorbancia control negativo (N) a 450 nm}} \right)$$

A continuación, este valor de % de inhibición puede convertirse a nmol/l de toxina unida mediante la fórmula:

$$0,2 \times 2^{(0,067 \times \% \text{ de inhibición de la muestra problema})}$$

Esta fórmula se ha obtenido de forma empírica utilizando la comparación de las mediciones de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina mediante los métodos ELISA y RIA de RSR. Para cada uno de los sueros, no se debe prever que haya mucha coincidencia entre los valores de nmol/l obtenidos en el ensayo ELISA para la determinación de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina mediante la curva de calibración y mediante esta fórmula.

RESULTADOS TÍPICOS MEDIANTE % DE INHIBICIÓN

| Muestra | Abs. 450 nm | % Inhibición | Calculado nmol/l |
|---------------------|-------------|--------------|------------------|
| Control negativo N | 1,842 | 0 | 0,2 |
| Control positivo P1 | 0,568 | 69,2 | 5,0 |
| Control positivo P2 | 1,132 | 38,5 | 1,2 |

VALOR DE CORTE DEL ENSAYO

| | |
|----------|--------------|
| Negativo | <0,45 nmol/l |
| Positivo | ≥0,45 nmol/l |

Este valor de corte ha sido validado por RSR. No obstante, cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia normales y patológicos para las concentraciones de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio grupo de muestras de control en el ensayo.

EVALUACIÓN DEL ENSAYO

Especificidad clínica

Se analizaron los sueros de 50 donantes de sangre sanos mediante el ensayo ELISA rápido para la determinación de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina; todos ellos (100 %) dieron negativo.

Sensibilidad clínica

Se analizaron los sueros de 48 pacientes con diagnóstico de miastenia grave mediante el ensayo ELISA rápido para la determinación de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina; 44 (92 %) de ellos dieron positivo.

Límite del blanco y límite de detección

El control negativo del kit y una muestra con contenido bajo de analitos se analizaron 20 veces en 3 lotes diferentes del kit y se calcularon el límite del blanco y el límite de detección.

El límite del blanco con 2 desviaciones estándar fue de 0,25 nmol/l.

El límite de detección fue de 0,30 nmol/l.

Precisión interensayo (n = 20)

| Muestra | % Inhibición | CV (%) | nmol/l | CV (%) |
|---------|--------------|--------|--------|--------|
| 1 | 12 | 21,1 | 0,35 | 11,6 |
| 2 | 52 | 2,7 | 2,3 | 6,8 |

| | | | | |
|---|----|-----|------|-----|
| 3 | 67 | 2,0 | 4,5 | 6,7 |
| 4 | 84 | 1,3 | 10,0 | 4,8 |

Precisión intraensayo (n = 25)

| Muestra | % Inhibición | CV (%) | nmol/l | CV (%) |
|---------|--------------|--------|--------|--------|
| 1 | 15 | 12,6 | 0,40 | 8,3 |
| 2 | 54 | 2,5 | 2,4 | 5,8 |
| 3 | 69 | 2,1 | 5,0 | 6,7 |
| 4 | 85 | 0,6 | 10,5 | 1,9 |

Exactitud clínica

El análisis de sueros de pacientes con enfermedades autoinmunitarias distintas de la miastenia grave no mostró ninguna interferencia de los autoanticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (n = 10), el factor reumatoide (n = 13), la 21-OH (n = 10) y el anticuerpo del receptor de TSH (n = 31).

CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA SEGURIDAD

Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD)

Palabra de advertencia: Atención 

Indicaciones de peligro

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabra de advertencia: Peligro 

Indicaciones de peligro

H360: Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.

Consejos de prudencia

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P308+P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Este kit es solo para uso profesional *in vitro*. Seguir cuidadosamente las instrucciones. Respetar las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas y el período de validez especificado para los pocillos recubiertos y los reactivos diluidos o reconstituidos. Consultar la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada sobre la seguridad. Evitar la ingestión, la inhalación, la inyección o el contacto con la piel, los ojos y la ropa de todos los componentes del kit. Utilizar ropa de protección. El material de origen humano utilizado en la preparación del kit ha sido analizado y ha dado negativo para anticuerpos anti-VIH-1 y 2 y anti-VHC y para HBsAg; no obstante, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Lavarse bien las manos si ha habido contaminación y antes de irse del laboratorio. Esterilizar todos los residuos potencialmente

contaminados, incluidas las muestras problema, antes de su eliminación. Si bien el material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Algunos

componentes contienen cantidades pequeñas de azida de sodio como conservante. Evitar la formación de azidas de metales pesados en el sistema de desagüe. Para ello, dejar correr agua abundante al aclarar cualquier componente del kit.

PLAN DE ENSAYO

| | |
|--|--|
| Dejar reposar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de utilizarlos. | |
| Pipetear: | 100 µl de calibradores (M1–4 opcionales), controles (N y P1–2) y sueros problema en tubos Eppendorf |
| Pipetear: | 25 µl de AChR (mezcla de tipo fetal y adulto B+C) (centrifugar en caso necesario) y mezclar en vórtex |
| Incubar: | 2 horas a temperatura ambiente |
| Pipetear: | 50 µl de mezcla de muestra-AChR (por duplicado) de cada tubo en los pocillos (excepto los blancos) |
| Incubar: | 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min |
| Aspirar/decantar: | Placa |
| Lavar: | La placa tres veces y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente |
| Pipetear: | 50 µl de MAb AChR-biotina (E) (reconstituido) en cada pocillo (excepto los blancos) |
| Incubar: | 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min |
| Aspirar/decantar: | Placa |
| Lavar: | La placa tres veces y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente |
| Pipetear: | 100 µl de SA-POD (G) (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto los blancos) |
| Incubar: | 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min |
| Aspirar/decantar: | Placa |
| Lavar: | La placa tres veces y aclarar con agua pura ³ ; secar golpeando suavemente sobre un material absorbente |
| Pipetear: | 100 µl de TMB (J) en cada pocillo (incluidos los blancos) |
| Incubar: | 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, sin agitar |
| Pipetear: | 50 µl de solución de parada (K) en cada pocillo (incluidos los blancos) y agitar durante 5 segundos |
| Leer la absorbancia a 450 nm en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada. | |
| ³ Omitir el lavado con agua si se utiliza un lavador de placas. | |