



FICHA TÉCNICA PRODUCTO

<i>Descripción producto</i>	<i>Código Menarini</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código Fabricante</i>
ANTI RECEPTOR ACETILCOLINA	30690	RSR LTD.	ACE/96



ElisaRSR™ AChRab

**Kit para ELISA 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 de autoanticuerpos antirreceptor de acetilcolina (AChRab, del inglés *acetylcholine receptor autoantibody*) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de AChRab en suero humano.

Los autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina (AChR, del inglés *acetylcholine receptor*) 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 BIBLIOGRÁFICAS

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 para la determinación de AChRab de RSR depende de la capacidad de los autoanticuerpos anti-AChR en el suero humano de unirse a sitios del receptor de acetilcolina similares a los que se unen diversos anticuerpos monoclonales (MAb, del inglés *monoclonal antibody*) como MAb1 (que recubre los pocillos de la placa de ELISA) y/o MAb2 y/o MAb3 (marcados con biotina). En ausencia de AChRab, se forma un complejo entre los MAb1 que recubren los pocillos de la placa, el AChR y los MAb2-biotina y MAb3-biotina. A continuación, se detectan los 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 AChRab, se inhibe la formación del complejo MAb1-AChR-MAb2-/MAb3-biotina, lo que tiene como consecuencia una menor unión de SA-POD y una

reducción de la absorbancia final a 450 nm. Cuanto mayor sea la concentración de AChRab en el suero problema, mayor será la inhibición de la unión de MAb-biotina. Cuando se utilizan los calibradores del kit, el intervalo de medición es de 0,45–20 nmol/l de toxina unida.

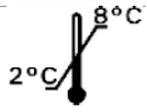
CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA DE SUERO

Los sueros a examinar deben analizarse poco después de su separación o conservarse, preferiblemente 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. En los estudios en los que se añadieron sueros positivos para AChRab a muestras de plasma con EDTA, citrato y heparina, se observaron cambios menores en la señal en comparación con el suero añadido del mismo donante. En particular, los valores de DO₄₅₀ con los plasmas con EDTA, citrato y heparina enriquecidos fueron del 83–122 % del suero añadido (20 muestras con concentraciones de suero de entre 0,28 nmol/l y 18 nmol/l) o del 69–165 % en términos de nmol/l.

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> utilizaciones
	Fecha de caducidad

	Limitación de temperatura
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	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 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.

Día 1	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 la noche (16-20 horas) a 2–8 °C.	
Día 2	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) (se recomienda hacerlo por duplicado), 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.	
	Día 2 (continuación)	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

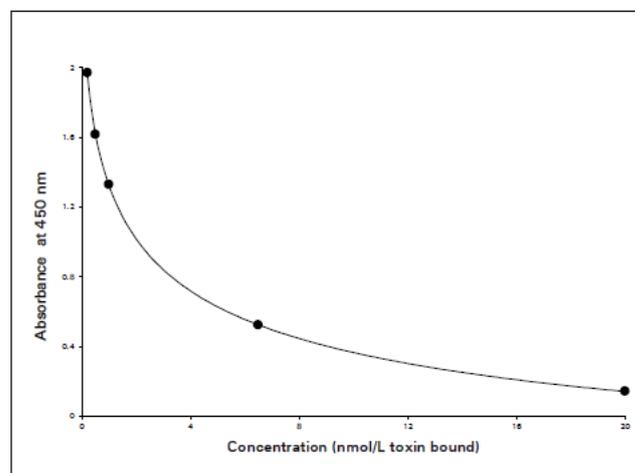
Se puede establecer una curva de calibración representando gráficamente la concentración de calibrador (incluido un valor de 0,2 nmol/l para el control negativo) en el eje de las abscisas (escala lineal) y la absorbancia de los calibradores en el eje de las ordenadas (escala lineal). A continuación, se pueden leer las concentraciones de AChRAB en los sueros de los pacientes 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 alta de AChRAB 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 AChRAB se recomienda utilizar la dilución con la que se obtenga un valor aproximado 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	1,970	0,2 ²
M1	1,616	0,5
M2	1,329	1,0
M3	0,524	6,5
M4	0,144	20
Control positivo P1	0,469	7,5
Control positivo P2	1,124	1,6

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



Absorbancia a 450 nm
Concentración (nmol/l toxina unida)

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

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

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 AChRAB 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 AChRAB mediante la curva de calibración y mediante esta fórmula.

RESULTADOS TÍPICOS MEDIANTE % DE INHIBICIÓN

Muestra	Abs. 450 nm	% Inhibición	nmol/l calculados
Control negativo N	1,970	0	0,2
Control positivo P1	0,469	76,2	6,9
Control positivo P2	1,124	42,9	1,5

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 AChRAB. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio grupo de muestras de control en el ensayo.

EVALUACIÓN DEL ENSAYO

Especificidad clínica

Se analizaron sueros de 402 donantes de sangre sanos mediante el ensayo ELISA para la determinación de AChRAB, de los cuales 401 (99,8 %) dieron negativo para AChRAB. Una muestra dio positivo, con un valor del 20 % de inhibición (0,54 nmol/l a partir de la curva de calibración, 0,52 nmol/l calculado).

Sensibilidad clínica

Se analizaron sueros de 83 pacientes con diagnóstico de miastenia grave mediante el ensayo ELISA para la determinación de AChRAB, de los cuales 76 (92 %) dieron positivo para AChRAB.

Límite inferior de detección

El control negativo se analizó 20 veces y se calcularon la media y la desviación estándar. El límite inferior de detección con 2 desviaciones estándar fue de 0,25 nmol/l.

Precisión interensayo (n = 20)

Muestra	% Inhibición	CV (%)	nmol/l	CV (%)
1	76,4	3,3	7,7	8,7
2	52,4	6,7	2,0	11,1
3	27,3	9,4	0,62	9,4

Precisión intraensayo (n = 24)

Muestra	% Inhibición	CV (%)	nmol/l	CV (%)
4	90,8	0,6	13,5	2,5
5	45,9	2,4	1,7	5,2
6	25,9	7,1	0,67	8,5

Exactitud clínica

El análisis de 107 sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunitarias distintas de la miastenia grave no mostró ninguna interferencia de los autoanticuerpos contra la tiroglobulina (n = 10), la peroxidasa tiroidea (n = 11), el ADNdc (n = 9), el receptor de TSH (n = 40), la descarboxilasa del ácido glutámico (n = 10) o la 21-hidroxilasa (n = 10), o del factor reumatoide (n = 27). En otras dos muestras, correspondientes a un paciente con enfermedad de Graves-Basedow (positivo para anticuerpos antirreceptor de TSH) y a otro con lupus eritematoso sistémico (positivo para anticuerpos anti-ADNdc), se obtuvieron valores de inhibición del 28 % (0,74 nmol/l) y el 44 % (1,5 nmol/l), respectivamente. Estas muestras se analizaron con el kit para RIA de AChRAB de RSR y dieron positivo (con valores de 1,3 nmol/l y 1,5 nmol/l, respectivamente). Además, dos muestras de pacientes con artritis reumatoide (positivos para factor reumatoide) dieron positivo con el kit para ELISA de AChRAB de RSR, con valores de inhibición del 24 % (0,77 nmol/l) y el 19 % (0,61 nmol/l). La primera de estas muestras también dio positivo con el kit para RIA de AChRAB de RSR (5,3 nmol/l).

Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron las siguientes sustancias a las muestras: hemoglobina hasta 250 mg/dl, bilirrubina a 20 mg/dl o intralípidos hasta 3000 mg/dl.

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 abundante agua y jabón

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

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

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Palabra de advertencia: Peligro



Indicaciones de peligro

H360: Puede perjudicar 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.

Diluyente para SA-POD

Indicaciones de peligro

EUH 208: Contiene 2-cloroacetamida. Puede provocar una reacción alérgica.

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

Día 1	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:	16–20 horas a 2–8 °C
Día 2	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.		