

# Prueba de Anticuerpos anti-beta 2 Glucoproteína 1 IgM ( $\beta_2$ GP1 IgM) ELISA

*Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas para la detección y determinación de anticuerpos  $\beta_2$ GP1 IgM en plasma o suero humano.*

GRUPO  
**MEXLAB**

ALTA CALIDAD EN PRUEBAS PARA SU LABORATORIO

## RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Paso	Temperatura (20-25°C)	Volumen	Tiempo de Incubación
1	Dilución de la muestra 1:101 = 5 $\mu$ l / 500 $\mu$ l		
2	Búfer de lavado (3 veces)	350 $\mu$ l	
3	Muestras, controles y calibradores diluidos	100 $\mu$ l	30 minutos
4	Búfer de lavado (3 veces)	350 $\mu$ l	
5	Conjugado de Enzimas	100 $\mu$ l	30 minutos
6	Búfer de lavado (3 veces)	350 $\mu$ l	
7	Sustrato cromogénico TMB	100 $\mu$ l	15 minutos
8	Solución de parada	100 $\mu$ l	
9	Lectura OD 450 nm		

### USO DE LA PRUEBA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de  $\beta_2$ GP1 IgM está diseñado para la detección y determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM contra  $\beta_2$ GP1 en suero o plasma humanos. Los resultados del ensayo deben usarse como ayuda en el diagnóstico de ciertas enfermedades autoinmunes, trastornos trombóticos, síndrome antifosfolípido, LES o trastornos similares al lupus.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los autoanticuerpos de cardioplipina (ACA) se describen para diversas enfermedades autoinmunes. La presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en el lupus eritematoso sistémico (LES) puede estar relacionada con el desarrollo de trombocitopenia; en ginecología, se supone que causan muerte intrauterina o abortos recurrentes. Además, se han encontrado anticuerpos anti-cardiolipina en algunos trastornos neurológicos no trombóticos como insuficiencia cerebrovascular, isquemia cerebral o corea y en el infarto de miocardio. (1)

Estudios recientes han demostrado que se requiere un cofactor de suero de 50 kD para que los anticuerpos anticardiolipina se unan a la cardioplipina que ha sido revestida sobre placas de plástico. El cofactor se ha identificado como  $\beta_2$ -glicoproteína 1, también denominada apolipoproteína H. La  $\beta_2$ GP1 se conoce como un inhibidor in vitro de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea, la agregación dependiente de ADP y la actividad protrombinasa de las plaquetas activadas. (2 ~ 7)

Se ha hecho evidente que el anticuerpo anticardiolipina de pacientes con síndrome anti-fosfolípido (APS) reconoce una estructura de  $\beta_2$ GP1 modificada y no cardioplipina,  $\beta_2$ GP1 nativa o un epítipo definido estructuralmente por cardioplipina y  $\beta_2$ GP1. (2 ~ 6)

Galli y col. (3) y Viard, et al. (8) informaron que el anticuerpo anti-cardiolipina derivado de SLE y APS se dirigió a la molécula de  $\beta_2$ GP1 recubierta en placas de poliestireno. Koike y Matsuura demostraron de manera concluyente que la  $\beta_2$ GP1 es de hecho el antígeno al que se unen muchos pacientes con anticuerpos anticardiolipina; además, mostró que el fosfolípido simplemente sirve para unir el  $\beta_2$ GP1 a la fase sólida. (2 ~ 9)

Los autoanticuerpos  $\beta_2$ GP1 se encuentran en las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA. La determinación de anticuerpos IgM es un indicador valioso en el diagnóstico del inicio de una enfermedad autoinmune, mientras que los anticuerpos IgG y / o IgA se encontrarán en etapas progresivas de trastornos autoinmunes manifestados. Los anticuerpos IgA a menudo se asocian con anticuerpos IgG. La determinación de anticuerpos IgA parece tener mayor validez en trombosis y pérdida fetal. (10). Las indicaciones para la determinación de anticuerpos anti  $\beta_2$ GP1 son: LES, trombosis, trombocitopenia, isquemia cerebral, corea, epilepsia, aborto recurrente y muerte intrauterina.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los antígenos  $\beta_2$ GP1 purificados se recubren sobre la superficie de los micropocillos. Se añaden a los pocillos suero o plasma diluido del paciente y calibradores. Los anticuerpos específicos anti  $\beta_2$ GP1, si están presentes, se unen a los antígenos. Todos los materiales no unidos se eliminan por lavado. Después de agregar el conjugado de enzima, se une al complejo anticuerpo-antígeno. Se lava el exceso de conjugado enzimático y se añade el sustrato cromogénico TMB. La reacción catalítica de la enzima conjugada se detiene en un momento específico. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgM en la muestra. Los resultados son leídos por un lector de micropocillos y comparados de forma paralela con calibradores.

### ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga siempre los micropocillos bien sellados en una bolsa con desecantes. Se recomienda utilizar todos los pocillos dentro de las 4 semanas posteriores a la apertura inicial de la bolsa.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, el sol o luz intensa durante el almacenamiento o el uso.

### RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

1. Recoja muestras de sangre y separe el suero.
2. Las muestras pueden refrigerarse a 2 - 8 ° C hasta por siete días o congelarse hasta por seis meses. Evite la congelación y descongelación repetidas de la muestra de suero.

### MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Tiras de micropocillos: pocillos recubiertos con antígeno  $\beta_2$ GP1. 12 x 8 pozos
2. Diluyente de muestra: Solución amarilla 50 ml / botella
3. Concentrado de lavado 50x. 15 ml / botella
4. Sustrato Cromogénico TMB: Frasco ámbar. 12 ml / botella
5. Conjugado enzimático: Solución de color rojo. 12 ml / botella
6. Juego de calibradores. 100 SMU
7. Conjunto de controles: Controles negativos y positivos. Los rangos se indican en cada etiqueta. 160  $\mu$ l / vial
8. Solución de parada: 12 ml / botella

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### 1. Materiales biopeligrosos potenciales:

El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano, que han sido probados y no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como el anticuerpo del VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de la ausencia del VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben manipularse en el nivel de bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Manual de salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos". 1984

2. No pipetear con la boca. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan las muestras o los reactivos del kit.

3. Los componentes de este kit están diseñados para usarse como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.

4. Este producto contiene componentes conservados con azida de sodio. La azida de sodio puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar una azida metálica explosiva. Al desechar, enjuague con una gran cantidad de agua.

5. Para evitar lesiones y quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos o la inhalación e ingestión de los siguientes reactivos: conjugado enzimático, sustrato cromogénico TMB y solución de parada.

## PREPARACIÓN DEL ENSAYO

### 1. Prepare búfer de lavado 1x.

Prepare el búfer de lavado agregando agua destilada o desionizada al concentrado de lavado 50x para obtener un volumen final de 750 ml.

2. Deje que todas las muestras y los reactivos del kit alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) y mezcle suavemente.

3. Preparación de la curva del calibrador. Se recomienda utilizar el juego de calibradores dentro de las 24 horas.

Para el calibrador A (100 SMU), agregue 10 µl de calibrador stock a 1 ml de diluyente de muestra. Prepare los calibradores B, C, D, E y F mediante una dilución en serie de 500 µl de calibrador A con el mismo volumen de diluyente de muestras.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### 1. Coloque la cantidad deseada de tiras recubiertas en el soporte.

PRELAVAR pocillos revestidos: repita el lavado tres veces con búfer de lavado.

2. Prepare una dilución 1: 101 de las muestras de prueba agregando 5 µl de la muestra a 500 µl de diluyente de muestra. Mezclar bien.

3. Dispense 100 µl de sueros diluidos y calibradores y controles prediluidos en los pocillos correspondientes. Toque el soporte para eliminar las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Retire el líquido de todos los pozos. Repita el lavado tres veces con búfer de lavado.

5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Retire el conjugado enzimático de todos los pocillos. Repita el lavado tres veces con búfer de lavado.

7. Dispense 100 µl de sustrato cromogénico TMB en cada pocillo e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.

8. Agregue 100 µl de solución de parada para detener la reacción. Asegúrese de que no haya burbujas de aire en cada pozo antes de leer.

9. Leer O.D. a 450 nm con un lector de micropocillos.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Construya una curva estándar trazando O.D. 450 nm en el eje y contra la concentración de los valores SAU del calibrador en el eje x en un papel cuadrículado log-log o un gráfico log-lin.

2. Usando el O.D. valor de cada muestra, determine la concentración a partir de la curva estándar.

3. Un ejemplo típico:

Juego de Calibradores	β <sub>2</sub> GP1 IgM (SMU)	O.D. 450 nm		O.D. 450 nm Media	DE	CV %
Calibrador F	3.13	0.060	0.073	0.067	0.009	13.8
Calibrador E	6.25	0.135	0.135	0.135	0.000	0.00
Calibrador D	12.5	0.255	0.254	0.255	0.001	0.27
Calibrador C	25	0.494	0.496	0.495	0.001	0.28
Calibrador B	50	0.961	0.931	0.946	0.021	2.24
Calibrador A	100	1.700	1.606	1.653	0.066	4.02

## CONTROL DE CALIDAD

1. El control negativo y el control positivo deben analizarse con cada lote de muestras analizadas y la concentración debe estar dentro del rango indicado en la etiqueta.

2. El valor del blanco D.O. (diluyente de la muestra) debe ser inferior a 0.150 y El valor D.O. del calibrador 100 SMU debe ser mayor que 0.750.

Pueden prepararse controles adicionales a partir de muestras de suero humano y mantenerse por debajo de -20°C.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal basado en sus propias técnicas, controles, equipos y población de pacientes de acuerdo con sus propios procedimientos establecidos. Las siguientes son una guía sugerente.

Negativo: <15 SMU

Positivo bajo: 15 ~ 30 SMU

Positivo moderado: 30 ~ 70 SMU

Positivo alto: > 70 SMU

Un resultado positivo sugiere la posibilidad de ciertas enfermedades autoinmunes o trastornos trombóticos. Un resultado negativo indica que no hay anticuerpos IgM β<sub>2</sub>GP1 o niveles por debajo del límite de detección del ensayo.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El diagnóstico no se puede realizar basándose únicamente en los resultados de anti β<sub>2</sub>GP1. Estos resultados deben usarse junto con la información de la evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico.

2. Cuando un nivel alto de anti β<sub>2</sub> GP1 IgG está en presencia de un nivel alto de IgM RF en una determinada muestra, existe la posibilidad de obtener un resultado de IgM falso.

3. Actualmente se está investigando la importancia clínica de los anticuerpos β<sub>2</sub>GP1 en enfermedades distintas del LES.

4. Cuando se encuentran títulos negativos de anti β<sub>2</sub>GP1 en presencia de indicaciones clínicas, está indicado un anticoagulante lúpico, anticardiolipina u otras pruebas adicionales.

5. Es de esperar que algunas muestras puedan ser positivas para anti-cardiolipina, pero negativas para anti-β<sub>2</sub>GP1. La prueba anti β<sub>2</sub>GP1 es un marcador más específico de riesgo trombótico. La prueba de anticardiolipina puede producir resultados falsos positivos debido a la reactividad cruzada con dsDNA o ciertos anticuerpos de enfermedades infecciosas.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Sensibilidad, especificidad y precisión:

Se ensayaron un total de 75 muestras con la prueba ELISA  $\beta$ 2GP1 IgM (valores X) y con un ELISA de referencia (1) (valores Y). La ecuación de correlación es:

$$Y = 0.6327 X + 13.242 \quad R^2 = 0.9056 \quad (n = 75)$$

		Referencia ELISA (1)		
		N	P	Total
$\beta$ 2GP1 IgM	N	25 (D)	7(B)	32
	P	2 (C)	41(A)	43
	Total	27	48	75

$$\text{Sensibilidad} = A / (A + B) = 41 / (41 + 7) = 85.4\%$$

$$\text{Especificidad} = D / (C + D) = 25 / (2 + 25) = 92.6\%$$

$$\text{Precisión} = (A + D) / (A + B + C + D) = 66 / 75 = 88\%$$

### Precisión:

Se calcularon las estadísticas de CV, media y desviación estándar para cada una de las tres muestras a partir de los resultados de 8 determinaciones en una única serie de intraensayo. La precisión interensayo se calculó a partir del resultado de 8 determinaciones de 8 corridas diferentes.

Intra-ensayo	n	Media SAU	DE	% CV
Suero A	8	23.38	1.30	5.57
Suero B	8	40.25	1.98	4.92
Suero C	8	80.38	0.74	0.93

Inter-ensayo	n	Media SAU	DE	% CV
Suero A	8	22.50	1.52	6.75
Suero B	8	41.32	2.13	5.15
Suero C	8	81.63	1.25	1.50

### INTERFERENCIA Y REACTIVIDAD CRUZADA

1. Un título alto de anti  $\beta$ 2GP1 IgG e IgA no disminuye la sensibilidad de la prueba para la anti  $\beta$ 2GP1 IgM.

2. Cuando una muestra que contiene una alta concentración de RF IgM se encuentra en presencia de un título alto de anti  $\beta$ 2GP1 IgG, puede inducir el potencial de un falso positivo.

3. La prueba de anti  $\beta$ 2GP1 IgM no presenta reacciones cruzadas con las siguientes muestras positivas de IgM analizadas: Toxo, Rubéola, CMV, Chlamydia trachomatis, Dengue, Paperas, Sarampión, EBV VCA, H. pylori y RF.

## REFERENCIAS

- Hughes, G.R.V., Harris, E.N. and Gharavi, A.E. The Anticardiolipin Syndrome. The Journal of Rheumatology 1986; 13, 3: 486 – 489.
- McNeil, H.P., R.J. Simpson, C.N. Chesteman, and S.A. Krilis. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: 2-glycoprotein (apolipoprotein H), Proc Natl Acad Sci USA, 87: 4120 – 4124, 1990.
- Galli, M., P. Comfurius, C. Maassen, H.C. Hemker, M.H. De Baets, P.J.C. Van Breda-Vriesman, T. Barbui, R.F.A. Zwaal, and E.M. Bevers. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet, 335: 1544 – 1547, 1990.
- Matsuura, E., Y. Igarashi, M. Fujimoto, K. Ichikawa, and T. Koike. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 336: 177 – 178, 1990.
- Koike, T. and E. Matsuura. What is the “true” antigen for anticardiolipin antibodies? Lancet, 337: 671 – 672, 1991.
- Matsuura, E., Y. Igarashi, M. Fujimoto, K. Ichikawa, T. Suzuki, T. Sumida, T. Yasuda, and T. Koike. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 148: 3885 – 3891, 1992.
- Nimph, J., H. Wurm, and G.M. Kostner. 2-glycoprotein (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. Atherosclerosis, 63: 109 – 114, 1987.
- Viard, J.P., Z. Amoura, and J.F. Bach. Association of anti- 2-glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. Am J Med, 93: 181 – 186, 1992.
- Tsutsumi A. et.al. Antibodies to 2-glycoprotein1 and clinical manifestations in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 39:1466 –1474, 1996.
- Lee, B., Siliver, R.M. et. al. Immunoglobulin A anti- 2GP1 antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. Am J Obstet Gynecol, 9: 748, 2001.