



COD 44704 96 Determinaciones

CONSERVAR A 2-8°C

Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-gliadina  
Sólo para uso *in vitro* en el laboratorio clínico**ANTICUERPOS ANTI-GLIADINA**Enzimoinmunoanálisis  
PRUEBA EN MICROPLACA**FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Los anticuerpos anti-gliadina presentes en el suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con anticuerpos anti-IgA humana o anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sustrato que da lugar a un producto soluble de color amarillo. La reacción enzimática se detiene con ácido y la formación de producto se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos anti-gliadina en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto formado<sup>1</sup>.

**CONTENIDO Y COMPOSICIÓN**

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón fosfatos 0,6 mol/L, detergente no iónico 6 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,6.
- B. Diluyente de Muestra.** 100 mL. Tampón fosfatos 30 mmol/L, cloruro de sodio 0,3 mol/L, albúmina bovina 5 g/L, detergente no iónico 0,5 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 6,7. Coloreado azul.
- C+. Control Positivo IgA.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-gliadina tipo IgA, azida de sodio 15 mmol/L.
- C+. Control Positivo IgG.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-gliadina tipo IgG, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 2 mL. Suero humano negativo para anticuerpos anti-gliadina, azida de sodio 15 mmol/L.
- DA. Conjugado IgA.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina A humana conjugada con peroxidasa. Coloreado verde.
- DG. Conjugado IgG.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa. Coloreado amarillo.
- E. Sustrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.

*PELIGRO: H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.*

- M. Microplaca.** 96 pocillos separables individualmente recubiertos con gliadina.
- S1A-S6A. Patrones Anti-gliadina IgA,** calibrados frente a un patrón de referencia interno. 1 mL, listos para su uso. Suero anti-gliadina, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos anti-gliadina tipo IgA son 0, 25, 50, 100, 150 y 200 U/L, según se indica en la etiqueta.
- S1G-S6G. Patrones Anti-gliadina IgG,** calibrados frente a un patrón de referencia interno. 1 mL, listos para su uso. Suero anti-gliadina, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos anti-gliadina tipo IgG son 0, 10, 20, 50, 100 y 200 U/L, según se indica en la etiqueta.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

*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 siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

**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 1/25 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 7 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. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/400 en Diluyente de Muestra (B) antes del ensayo.

**PROCEDIMIENTO**

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca 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.
  - **Cualitativa:** Pipetear 100 µL de Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra (B) 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 4 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (DA o DG) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos como en el paso 4.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar las tiras durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 5).

12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón 0 UI/mL (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-gliadina (U/L). La concentración de anticuerpos anti-gliadina en la muestra se calcula por interpolación en la curva de calibración (curvas recomendadas: 4-parametric logistic, cubic spline, one site-hyperbola).

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

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} \text{ Control Positivo} \times 0,18 \text{ (IgA)}$$

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} \text{ Control Positivo} \times 0,36 \text{ (IgG)}$$

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 (B) y repetir la operación.

## VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con concentraciones superiores a 18 U/L para IgA y 24 U/L para IgG, o con razón de absorbancia superior a 1,1.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 12 U/L para IgA y 16 U/L para IgG, o con razón de absorbancia inferior a 0,9. Las muestras con concentraciones comprendidas entre 12 y 18 U/L para IgA, y entre 16 y 24 U/L para IgG, o con razones comprendidas entre 0,9 y 1,1 deben considerarse dudosas y se recomienda la repetición del ensayo o la determinación de parámetros alternativos de valor diagnóstico.

Estos valores se dan únicamente a título orientativo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

## CONTROL DE CALIDAD

La concentración de los Controles Positivos tanto IgA como IgG debe estar comprendida entre 80 y 120 U/L y la del Control Negativo debe ser inferior a 12 U/L para IgA y 16 U/L para IgG.

La razón de absorbancia para el Control Positivo debe ser superior a 1,1 y para el Control Negativo debe ser inferior a 0,9.

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):

U/L IgA	CV %	n	U/L IgG	CV%	n
20	5,6	25	45	9,0	25
76	12,4	25	83	10,5	25

– Reproducibilidad (interserie):

U/L IgA	CV %	n	U/L IgG	CV%	n
20	5,7	25	45	8,1	25
76	9,2	25	83	15,2	25

- Límite de detección: 0,5 U/L (IgA) - 0,2 U/L (IgG)
- Intervalo de medida: 0,5 U/L - 200 U/L (IgA) y 0,2 U/L - 200 U/L (IgG). Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la medición.
- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Interferencias: La hemólisis (hemoglobina < 500 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 1625 mg/dL), la bilirrubina (< 30 mg/dL) y el factor reumatoide (< 300 UI/mL) no interfieren. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir<sup>2</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La determinación por enzimoanálisis de anticuerpos anti-gliadina muestra una gran heterogeneidad en la sensibilidad y la especificidad para la enfermedad celiaca dependiendo del estudio y la población<sup>3</sup>. En general, la sensibilidad es del 80 – 90% para los anticuerpos del tipo IgA, y del 70-100% para los del tipo IgG. En cuanto a la especificidad, en la mayoría de estudios varía también del 80-90% para anticuerpos IgA y el 70-90% para anticuerpos IgG<sup>3</sup>.

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 un máximo de 12 meses.
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 debe pipetarse 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, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garrity C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The Diagnostic Accuracy of Serologic Tests for Celiac Disease: A Systematic Review. Gastroenterology 2005;128: S38-S46.