

COD 44520 48 determinaciones	COD 44524 96 determinaciones
COD 44521 12 x 	COD 44525 12 x 
CONSERVAR A 2-8°C	
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-músculo liso Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

ANTI-SMOOTH MUSCLE ANTIBODIES (ASMA)



ANTICUERPOS ANTI-MÚSCULO LISO (ASMA)

ESTÓMAGO DE RATA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-músculo liso (ASMA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en una sección de estómago de rata. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia.

CONTENIDO

	COD 44520	COD 44524
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Control Positivo ASMA	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	1 x 2,5 mL	2 x 2,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 12	1 x 12

	COD 44521	COD 44525
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de estómago de rata (RS) en cada pocillo.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Control Positivo ASMA:** Suero humano con anticuerpos anti-músculo liso (ASMA), azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. FITC/Evans (R):** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y adsorbidas con suero de rata, azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje: Glicerol 78%, fosfato de sodio 6 mmol/L, fosfato de potasio 1,6 mmol/L, cloruro de sodio 60 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante**

Los sueros humanos utilizados en la preparación 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 controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos 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:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en la sección del tejido.

REACTIVOS AUXILIARES

- Cod 44520 y 44524 no precisan de reactivos auxiliares.
- Cod 44521 y 44525 precisan de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
 - B. PBS (10x).**
 - D. FITC/Evans (R),** conjugado con contratinción de azul de Evans, o **FITC (R),** conjugado sin contratinción de azul de Evans.
 - E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
 - C-. Control Negativo.**

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 semana a 2-8°C.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/20 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/20.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (50 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos, procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. La sección de tejido debe permanecer siempre húmeda.
8. Depositar una gota de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación en la zona interior de la sección del tejido. La intensidad de fluorescencia de la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

Los sueros que presentan fluorescencia en la mucosa muscular, en las capas musculares de los vasos sanguíneos y en las fibras interglándulares en el estómago de rata a las diluciones recomendadas se deben considerar positivos.

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cuando no se observa ninguno de los marcajes específicos descritos, el resultado es negativo para los autoanticuerpos indicados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (C+) y el Control Negativo (C-) suministrados con los kits cod 44520 y cod 44524 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo (C+) debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo (C-) no debe proporcionar marcaje específico alguno.

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 DEL ENSAYO

Los conjugados FITC/Evans (R) y FITC (R) están calibrados frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo ASMA está verificada frente al suero de referencia con anticuerpos anti-músculo liso (anti-actina) W1062 de la OMS.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los anticuerpos anti-músculo liso son los marcadores estándar de diagnóstico de la Hepatitis Autoinmune. Los anticuerpos anti-actina, un subgrupo de anticuerpos anti-músculo liso, se encuentran en el suero de un 52-85% de pacientes con hepatitis autoinmune crónica activa y en un 22% de los pacientes con cirrosis biliar primaria. Su presencia en otras enfermedades autoinmunes como la colangiopatía refleja la sobreposición de este carácter distintivo de estas enfermedades.

El kit BioSystems anticuerpos anti-músculo liso fue usado con 71 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación.

Enfermedades	n	Positivo	Negativo
<i>Enfermedades Autoinmunes de Hígado</i>	22	15	7
Colangitis	10	4	6
Hepatitis Autoinmune	12	11	1
<i>Otras enfermedades autoinmunes</i>	25	0	25
Anemia Megaloblástica	3	0	3
Enfermedad Celiaca	7	0	7
Tiroiditis	9	0	9
Síndrome de Good Pasture	2	0	2
Otras (vasculitis, antifosfolípidos)	4	0	4
<i>Controles Sanos</i>	24	0	24

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Evitar tocar las secciones de tejidos fijadas en los pocillos durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnickoff M.J. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.