



COD 44148 16 determinaciones	COD 44548 48 determinaciones	COD 44715 96 determinaciones
COD 44557 12 x 	COD 44710 12 x 	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-endomisio Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico		

ANTI-ENDOMYSIUM ANTIBODIES (AEA)



ANTICUERPOS ANTI-ENDOMISIO (AEA) ESÓFAGO DE MONO (ENDOMISIO)

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-endomisio (AEA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en la sección del tercio inferior del esófago de mono. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas A humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

	COD 44148	COD 44548	COD 44715
A. Portaobjetos	4 x 4 pocillos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Control Positivo AEA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. IgA FITC/Evans	1 x 2,5 mL	1 x 2,5 mL	2 x 2,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 4	1 x 12	1 x 12

	COD 44557	COD 44710
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de esófago de mono (endomisio) 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 AEA: Suero humano con anticuerpos anti-endomisio (AEA), azida de sodio 0,95 g/L.
- C-.** Control Negativo: Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. IgA FITC/Evans :** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgA humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), 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 44148, 44548 y 44715 no precisan de reactivos auxiliares.
- Cod 44557 y 44710 precisan de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
 - B. PBS (10x).**
 - D. IgA FITC/Evans,** conjugado con contratinción de azul de Evans, o **IgA FITC,** conjugado sin contratinción de azul de Evans.
 - D. IgG FITC/Evans (M).**
 - 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 1/5 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 1/5.

PROCEDIMIENTO

- Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
- Depositar una gota (50 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos, procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).

- Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
- Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
- Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
- Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
- Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. La sección de tejido debe permanecer siempre húmeda.
- 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.
- Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
- 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 de la zona interna de la sección de tejido. La intensidad de marcaje de la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

Los sueros que presentan fluorescencia tipo reticular en la capa de musculatura lisa más próxima a la mucosa del esófago de mono a la dilución recomendada deberán considerarse 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 44148, cod 44548 y cod 44715 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 IgA FITC/Evans e IgA FITC están calibrados frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC. El conjugado IgG FITC/Evans (M) está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas IgG humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo AEA está verificada frente a un suero humano de referencia interna.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los anticuerpos anti-endomisio (AEA) de tipo IgA se encuentran en pacientes con enfermedad celíaca activa o dermatitis herpetiforme. La sensibilidad de diagnóstico para la enfermedad celíaca es del 68-100% en pacientes no tratados, y la especificidad de diagnóstico es del 99-100% sugiriendo un alto valor predictivo positivo y negativo^{2,3}.

La sensibilidad de los anticuerpos IgA-AEA para la dermatitis herpetiforme es del 70-80% pero se incrementa al 100% cuando va asociada una enteropatía gluten-sensible⁴. En el caso de pacientes celíacos con deficiencia congénita de IgA, pueden detectarse anticuerpos específicos utilizando el conjugado IgG FITC/Evans (M).

El kit BioSystems anticuerpos anti-endomisio fue usado con 125 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

n	Pacientes	IgA		IgG	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
50	Enfermedad Celíaca	50	0		
20	Otras enfermedades autoinmunes	0	20		
5	Enfermedad Celíaca con déficit de IgA	0	5	2	3
50	Controles Sanos	0	50	0	50

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

NOTAS

- Evitar tocar la sección de tejido fijado en los pocillos durante todo el procedimiento.
- Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Kapuscinska A et al. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1987; 6:529-534.
- Scott H and Brandtzaeg P. Endomysial autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Hälstrom O. Comparison of IgA-class reticulín and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Gut 1989; 30:1225 - 1232.