



AUTOANTIBODIES-RK/RS (AA-RK/RS)

COD 44756 16 determinaciones	COD 44757 48 determinaciones	COD 44758 96 determinaciones
COD 44569 12 x	COD 44568 12 x	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos autoinmunes Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico		

AUTOANTICUERPOS-RK/RS (AA-RK/RS)

Inmunofluorescencia Indirecta
RIÑÓN/ESTÓMAGO DE RATA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos del suero anti-mitocondriales (AMA), anti-músculo liso (ASMA), anti-células parietales (APCA), anti-reticulina y otros, se unen a sus correspondientes antígenos presentes en una preparación que contiene riñón y estómago de rata. El complejo antígeno-anticuerpo resultante se detecta mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y visualizado por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

	COD 44756	COD 44757	COD 44758
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 AMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C+. Control Positivo ASMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	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 44569	COD 44568
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de riñón y estómago de rata (RK/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 AMA:** Suero humano con anticuerpos anti-mitocondriales (AMA), azida de sodio 0,95 g/L.
- 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 adsorbidos 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 44756, 44757 y 44758 no precisan de reactivos auxiliares.
- Cod 44569 y 44568 precisan de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
 - B. PBS (10x).**
 - D. FITC/Evans (R),** conjugado con contratención de azul de Evans, o **FITC (R),** conjugado sin contratención de azul de Evans.
 - E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
- El Control Positivo APCA puede adquirirse de forma separada:
 - C+. Control Positivo APCA:** Anticuerpos anti-células parietales (APCA).
 - 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. El tejido debe permanecer siempre húmedo.
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 de la zona interior de la sección de tejido. La intensidad de fluorescencia en la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada.

AMA: Fluorescencia granular de las mitocondrias en el citoplasma de las células tubulares renales.

ASMA: Marcaje de la mucosa muscular, las capas de músculo de los vasos sanguíneos y las fibras interglandulares, en el estómago de rata.

APCA: Marcaje reticular intracelular de las células parietales de la mucosa gástrica de rata.

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 cod 44756, cod 44757 y cod 44758 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 AMA está verificada frente a un suero de referencia interno. La especificidad del Control Positivo ASMA está verificada frente al suero de referencia anti-músculo liso (anti-actina) W1062 de la OMS.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

AMA: La presencia de anticuerpos anti-mitocondriales se asocia con cirrosis biliar primaria por encima del 95% de pacientes^{3,4}.

ASMA: Los anticuerpos anti-músculo liso son el marcador de diagnóstico estándar de la Hepatitis Autoinmune. Los anticuerpos anti-actina, un subgrupo de anticuerpos anti-músculo liso, se encuentran en los sueros de un 52-85% de pacientes con hepatitis activa crónica autoinmune y en un 22% de pacientes con cirrosis biliar primaria. Su presencia en otras enfermedades autoinmunes como la colangiopatía refleja la superposición de características de estas enfermedades^{4,5}.

APCA: Los anticuerpos anti-células parietales se encuentran en un 90% de los pacientes con anemia perniciosa, asociada normalmente con otras enfermedades autoinmunes específicas de tejido⁶.

El kit BioSystems autoanticuerpos-RK/RS fue usado con 95 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

Enfermedades	n	AMA	ASMA
<i>Enfermedades hepáticas</i>	46	41	22
<i>Cirrosis biliar primaria</i>	24	22	5
<i>Colangitis</i>	10	8	6
<i>Hepatitis Autoinmune</i>	12	11	11
<i>Otras enfermedades Autoinmunes</i>	25	0	0
<i>Anemia Megaloblástica</i>	3	0	0
<i>Enfermedad Celíaca</i>	7	0	0
<i>Tiroiditis</i>	9	0	0
<i>Síndrome de Good Pasture</i>	2	0	0
<i>Otras (vasculitis, AFL)</i>	4	0	0
<i>Controles sanos</i>	24	0	0

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 tejido de 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
4. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
5. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996