



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



COD 44558 48 determinaciones	COD 44648 96 determinaciones
COD 44570 12 x 4 determinaciones	COD 44639 12 x 8 determinaciones
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-RL/RK/RS (AA-RL/RK/RS)

Inmunofluorescencia Indirecta
HÍGADO/RIÑÓN/ESTÓMAGO DE RATA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los autoanticuerpos del suero dirigidos contra el núcleo (ANA), las mitocondrias (AMA), el músculo liso (ASMA), las células parietales gástricas (APCA), los microsomas de hígado-riñón (LKM), la reticulina y otros, se unen a sus correspondientes antígenos presentes en la preparación que contiene hígado, 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 44558	COD 44648
A. Portaobjetos	12 x 4 det.	12 x 8 det.
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Control Positivo ANA-Ho	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C+. Control Positivo AMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C+. Control Positivo ASMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	1 x 3,5 mL	2 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 12	1 x 12

	COD 44570	COD 44639
A. Portaobjetos	12 x 4 det.	12 x 8 det.

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de hígado, riñón y estómago de rata.
- 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 ANA-Ho:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón homogéneo, azida de sodio 0,95 g/L.
- 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: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 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

- B. PBS (10x).**
- D. FITC/Evans (R),** conjugado con contratinción de azul de Evans.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
- C+. Control Positivo ANA-Sp:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares patrón moteado, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Nu:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares patrón nucleolar, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo APCA:** Suero humano con anticuerpos anti-células parietales, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo LKM:** Suero humano con anticuerpos anti-hígado-riñón microsomal (LKM), azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Ho.**
- C+. Control Positivo AMA.**
- C+. Control Positivo ASMA.**
- C-. Control Negativo.**

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

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 que el tejido esté cubierto 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 la sección de tejido con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato, evitando el centro y el borde del tejido.

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

ANA-homogéneo: Fluorescencia uniforme y homogénea en todo el interior del núcleo de la célula en interfase. Fluorescencia intensa en las células en mitosis.

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.

LKM: Tipo I. Marcaje intenso del citoplasma del hepatocito en el hígado y del citoplasma de los túbulos proximales en el riñón. Túbulos distales negativos.

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 44558 y cod 44648 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

El conjugado FITC/Evans (R) está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo ANA-Ho está verificada frente al suero de referencia AF/CDC1 de los *Centers for Disease Control /Arthritis Foundation*.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: La determinación de anticuerpos anti-nucleares tiene una sensibilidad superior al 95% para el lupus eritematoso sistémico, y una baja especificidad².

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 se encuentran en el suero de un 52-85% de pacientes con hepatitis activa crónica autoinmune y en un 22% de pacientes con cirrosis biliar primaria^{5,6}.

APCA: Los anticuerpos anti-células parietales se encuentran en un 90% de pacientes con anemia perniciosa, asociada normalmente con otras enfermedades autoinmunes específicas de tejido⁷.

LKM: Los anticuerpos anti-LKM tipo I se consideran marcadores de la hepatitis autoinmune tipo II⁸.

El kit BioSystems Autoanticuerpos-RL/RK/RS fue usado con 188 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

Enfermedades	n	ANA	AMA	ASMA
<i>Enfermedades hepáticas</i>	46	-	41	17
<i>Cirrosis biliar primaria</i>	24	-	22	5
<i>Colangitis</i>	10	-	8	4
<i>Hepatitis Autoinmune</i>	12	-	11	8
<i>Enfermedades de tejido conectivo</i>	93	93	-	-
<i>Lupus eritematoso sistémico</i>	31	31	-	-
<i>Síndrome de Sjögren</i>	11	11	-	-
<i>Escleroderma</i>	7	7	-	-
<i>Síndrome CREST</i>	3	3	-	-
<i>Artritis reumatoide</i>	11	11	-	-
<i>Dermatopolimiositis</i>	2	2	-	-
<i>Otros</i>	28	28	-	-
<i>Otras enfermedades autoinmunes</i>	25	0	0	0
<i>Anemia Megaloblástica</i>	3	0	0	0
<i>Enfermedad Celíaca</i>	7	0	0	0
<i>Tiroiditis</i>	9	0	0	0
<i>Síndrome de Good Pasture</i>	2	0	0	0
<i>Otros (vasculitis, AFL)</i>	4	0	0	0
<i>Controles sanos</i>	24	0	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. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. 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.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.