



COD 44560 48 determinaciones	COD 44561 12 x 4 determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C	
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-epidérmicos Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

ANTICUERPOS ANTI-EPIDÉRMICOS (ASA)

Inmunofluorescencia Indirecta
ESÓFAGO DE MONO

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-epidérmicos del suero se unen a su correspondiente antígeno presente en el esófago de mono. El complejo antígeno-anticuerpo resultante se detecta mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas G humanas conjugado con fluoresceína y se visualiza mediante microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

COD 44560	
A. Portaobjetos	12 x 4 determinaciones
B. PBS (10x)	1 x 100 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans (M)	1 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 12
COD 44561	
A. Portaobjetos	12 x 4 determinaciones

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de esófago de mono.
- 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 Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans (M):** Anticuerpos anti-IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y adsorbidos con suero de mono, 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. IgG FITC/Evans (M).**
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
- C+. Control Positivo ASA-is:** Suero humano con anticuerpos anti-epidérmicos contra la sustancia intercelular, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ASA-bm:** Suero humano con anticuerpos anti-epidérmicos contra la membrana basal, azida de sodio 0,95 g/L.
- 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 1/10 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 1/10.

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 que el tejido esté cubierto 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.

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 tejido 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 del marcaje fluorescente específico descrito a continuación debe considerarse un resultado positivo a la dilución recomendada.

ASA-sustancia intercelular: Fluorescencia en el espacio intercelular del epitelio.

ASA-membrana basal: Fluorescencia lineal de la membrana basal epitelial.

Las muestras positivas pueden titularse.

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

CONTROL DE CALIDAD

Los Controles Positivos (C+1 y C+2) y el Control Negativo (C-) deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

Los Controles Positivos deben proporcionar los marcajes específicos descritos en el apartado anterior.

El Control Negativo 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 IgG FITC/Evans (M) está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.
- Los anticuerpos ASA-sustancia intercelular reconocen a la desmogleína 3, un constituyente de los desmosomas epidérmicos. Es una molécula de adhesión perteneciente a la familia de las caderinas.
- Los anticuerpos ASA-membrana basal se unen a antígenos localizados en el espacio entre la lamina densa y el hemidesmosoma, localizado en el polo dermal de los queratinocitos basales.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de anticuerpos anti-epidérmicos contra el espacio intercelular del epitelio estratificado escamoso es característica de pacientes con pénfigo, pénfigo foliáceo y pénfigo paraneoplásico. Aunque los resultados de inmunofluorescencia indirecta son muy específicos para pénfigo, el tipo de pénfigo no puede diferenciarse con esta técnica. En un pequeño porcentaje de pacientes con pénfigo, los anticuerpos no pueden detectarse puesto que ya se han unido a la piel del paciente².

Los anticuerpos contra la membrana basal se hallan en un 70% de pacientes con penfigoide ampuloso, en un 20 – 25% de pacientes con herpes gestationis y en un 10% de pacientes con penfigoide cicatricial³.

El kit BioSystems Anticuerpos anti-epidérmicos fue usado con 91 sueros de pacientes con enfermedades ampulosas así como donantes sanos. Los resultados aparecen a continuación:

Grupos	n	ASA-is	ASA-bm
Enfermos de pénfigo	23	18	0
Enfermos de penfigoide ampuloso	18	0	16
Controles sanos	50	0	0

La sensibilidad de la determinación de ASA BioSystems es 78% para el pénfigo y 89% para el penfigoide ampuloso, mientras que la especificidad es del 100% para ambas enfermedades.

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. Mascaró JM, Fairley JA, Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Giudice GJ and Díaz LA. Autoantibodies in bullous pemphigoid, herpes gestationis and cicatricial pemphigoid. En: En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.