

COD 44510 48 determinaciones	COD 44514 96 determinaciones
COD 44511 12 x 	COD 44515 12 x 
CONSERVAR A 2-8°C	
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-mitocondriales Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

## ANTI-MITOCHONDRIAL ANTIBODIES (AMA)



## ANTICUERPOS ANTI-MITOCONDRIALES (AMA) RIÑÓN DE RATA

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-mitocondriales (AMA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en las secciones de riñón 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 44510	COD 44514
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Control Positivo AMA	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 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 44511	COD 44515
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos	12 x 8 pocillos

### COMPOSICIÓN

- Portaobjetos: Secciones de riñón de rata (RK-AMA) en cada pocillo.
- PBS (10x): Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,5 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 Negativo: Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- 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.
- Mounting Medium. Medio de Montaje: Medio de Montaje: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- 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 en la sección del tejido como ralladuras o despegues.

### REACTIVOS AUXILIARES

- Cod 44510 y 44514 no precisan de reactivos auxiliares.
- Cod 44511 y 44515 precisan de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
  - PBS (10x).
  - FITC/Evans (R), conjugado con contratinción de azul de Evans.
  - Mounting Medium. Medio de Montaje.
- C+. Control Positivo AMA.
- 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 1/10 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 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 del tejido. La intensidad de la fluorescencia en la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

Los sueros que presentan una fluorescencia granular de las mitocondrias en el citoplasma de las células tubulares renales a las diluciones recomendadas deben 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 44510 y cod 44514 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 AMA está verificada frente a un suero interno de referencia.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de anticuerpos anti-mitocondriales está asociada con la cirrosis biliar primaria (superior al 95% de los pacientes)<sup>2,3</sup>.

El kit BioSystems anticuerpos anti-mitocondriales fue usado con 95 sueros de una variedad de pacientes autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

Enfermedades	n	Positivo	Negativo
<i>Enfermedades Hepáticas</i>	<b>46</b>	<b>41</b>	<b>5</b>
<i>Cirrosis Biliar Primaria</i>	24	22	2
<i>Colangitis</i>	10	8	2
<i>Hepatitis Autoinmune</i>	12	11	1
<i>Otras Enfermedades Autoinmunes</i>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>25</b>
<i>Anemia Megaloblástica</i>	3	0	3
<i>Enfermedad Celíaca</i>	7	0	7
<i>Tiroiditis</i>	9	0	9
<i>Síndrome de Good Pasture</i>	2	0	2
<i>Otros (vasculitis, AFL)</i>	4	0	4
<i>Controles Sanos</i>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>24</b>

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 de 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 M.J. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- 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.