



ImmuGlo™ Anti-Mielin

Asoció Anticuerpo (anti-MAG) IFA

IVD

REF 1172 48 determinaciones

Para la investigación y la detección por inmunofluorescencia indirecta (IF) del glicoproteínas anti-mielin asoció (anti-MAG) y otros autoanticuerpos del glicolípidos en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las respuestas autoinmunes del sistema nervioso periférico, reconocidas como *neuropatías periféricas*, son manifestaciones asociadas a los autoanticuerpos contra varios glicoconjugados de los nervios. Estos neuropatías pueden ser agudos, crónico, implican la degeneración del axón, o el demielinación. Los neuropatías autoinmunes se pueden dividir más a fondo en gammopatías monoclonal y polineuropatías inflamatorias del polyclonal como el síndrome de *Guillain-Barré*, *la polineuropatía inflamatoria crónica* (CIDP), *la motor neuropatía multifocal* (MMN), y *los neuropatías paraneoplástico*. En estas enfermedades, hay un traslapeo significativo de los autoantígenos implicados que median el mecanismo patógeno. Los autoanticuerpos específicos del nervio periférico siguiente se encuentran en estos neuropatías:

- a) **glicoproteína asociada del anti-mielin (MAG),**
- b) **los glicolípidos anti-acidos como del sulfoglucoronil paragloboside (SGPG),**
- c) **anti-gangliosidos**
- d) **las proteínas anti-compacto asociadas del mielin como de P0, de P2, y de la proteína periférica 22 del mielin (PMP22)¹⁻⁶.**

El epitope (HNK1) reconocido por los autoanticuerpos humanos del MAG es un oligosacárido sulfatado. Este mismo epitope es compartido por SGPG, P0 y PMP22⁷. Neuropatías asociado a anti-MAG con el paraproteinemia de IgM es generalmente un grupo heterogéneo de la enfermedad, lentamente progresista con la evidencia del demielinación y un grado variable de pérdida axonal asociado generalmente a la ataxia del paso. De todos los casos periféricos de la neuropatía con el paraproteinemia de IgM, los 50% poseen los anticuerpos anti-MAG⁸. Se percibe que estos autoanticuerpos pudieron interferir con el proceso del demielinación, con mantenimiento del mielin, o con interacciones de la célula del axon-Schwann. Por lo tanto, la detección de estos autoanticuerpos es útil para el clínico, pues sugiere el demielination activo en una neuropatía periférica.

La técnica IF es un método sensible para la investigación y la detección de estas proteínas del anti-nervio y autoanticuerpos anti-mielin asociados del gangliosidas. Si el espécimen no rinde ningún inmunoreactivación por inmunofluorescencia el resultado se divulga como negativa. La especificidad del espécimen, positivo resuelto de IFA, se debe confirmar por Western immunoblot (anti-MAG) o por ELISA (anti-gangliosidas).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los anticuerpos al mag y a otros glicoconjugados periféricos del nervio son detectados por inmunofluorescencia indirecta usando un sustrato periférico del nervio del primate.

Los sueros pacientes se incuban en la sección para permitir atar de anticuerpos a los antígenos específicos del sustrato. La cualquier inmunoglobulina y la otra proteína del suero no limitada a las secciones del tejido fino son quitadas aclarando. Los anticuerpos encuadrados de la clase de IgM son detectados por la incubación del sustrato con la FITC conjugado de IgM. Las reacciones se observan debajo de un microscopio de la fluorescencia equipado de los filtros apropiados. La presencia de anticuerpos de una

especificidad es determinada por sus reacciones específicas al nervio. Los anticuerpos anti-MAG manchan específicamente la membrana oligodendroglial del periaxonas, las membranas periaxonal de la célula de Schwann, y los mesaxons internos y externos de la envoltura del nervio.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales Suministrados

EMA IFA	REF	1172	
El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 48 determinaciones.			
8x	SORB SLD 6		Portaobjetos de 6 pocillos con substrato nervio periférico .
1 x 0,5 ml	CONTROL+ MAG		Control positivo de EMA , suero humano
1 x 0,5 ml	CONTROL-		Control negativo , suero humano
1 x 5 ml	IgM-CONJ FITC		Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgM anti humana con BSA. Proteger de la luz
1 x 60 ml	BUF		Diluyente de la muestra con BSA
2 viales	BUF WASH		Fosfato salino tamponado (PBS) . Disolver cada vial en 1 litro
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM		Medio de preparación . No congelar
1 x 1,0 ml	EVANS		Colorante de contraste azul de Evans*
1 x 12	COVER SLD		Cubreobjetos

Símbolos empleados en las etiquetas:

	Número de lote
	Número de catálogo
	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de análisis
	Fabricante
	Fecha de fabricación



*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia
 Micropipetas o pipeta Pasteur
 Pipetas serológicas
 Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)
 Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo
 Agua destilada o desionizada
 Envase de 1 litro
 Frasco de lavado
 Toallas de papel
 Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material ¹⁴.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO**Método de ensayo****A. Detección sistemática**

1. Diluir 1:10 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,1 ml de suero + 0,9 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el sustrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el sustrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μ l) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el

portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.

8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede aumentar fluorescencia del fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidestefimiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 5- 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 6. Añadir 0,9 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,2 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,2ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,9ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transferencia	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica del nervio se lía; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 1+.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba para los anticuerpos del anti-nervio se deben divulgar como negativo (< 10) o positivo con título. Para los anticuerpos anti-MAG, leer para mancharse de la membrana oligodendroglial del periaxonas, de las membranas periaxonal de la célula de Schwann, y de los mesaxons internos y externos de la envoltura del nervio según lo demostrado en el cuadro 1 en el extremo de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunas cajas, los sueros positivos para los anticuerpos anti-MAG pueden ser muy débiles o negativa en la dilución inicial de la investigación (fenómeno del prozone). En tales casos dudosos los sueros se deben reexaminar en diluciones más altas y, si positivo, títulos del anticuerpo determinados.

La presencia de dos o más anticuerpos en un suero que sean reactivos con el substrato puede causar una interferencia en su detección por inmunofluorescencia dando por resultado, una falta de detectar los anticuerpos anti-MAG, o la supresión del título.

Además, otros patrones distintos de la reacción en las secciones periféricas del nervio se pueden también observar en los sueros positivos para el anti-SGPG, anti-P0, anti-MOG y anti-PMP22. Tales reacciones pueden no ser fácilmente distinguibles de anti-Mag debido al hecho de que comparten el epitope HNK1. Se recomienda que todas las muestras positivas sean confirmadas para la especificidad del anticuerpo por técnicas del inmunoblot.

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Quarles RH, and Weiss MD. Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. *Muscle & Nerve*; 22:800-822, 1999.
2. Griffin J. Antiglycolipid antibodies and peripheral neuropathies: links to pathogenesis. *Prog Brain Res*; 101: 313-323, 1994.
3. Quarles RH. Glycoproteins of the myelin sheaths. *J. Mol. Neurosci*; 8:1-12, 1997.
4. Kanda T, Yoshino H, Ariga T et al. Glycosphingolipid antigens in cultured bovine brain microvascular endothelial cells: Sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J. Cell Biol*; 126:235-246, 1994.
5. Hammer JA, O'Shannessy DJ, and De LM et al. Immunoreactivity of PMP-22, P0, and other 19 to 28kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK1 and related antibodies. *J. Neurosci Res*; 35:546-558, 1993.
6. Baba H, Daune GC, Ilyas AA et al. anti-GM1 ganglioside antibodies with differing fine specificities in patients with multifocal motor neuropathy. *J. Neuroimmunol*; 25:143-150, 1989.
7. Field MC, Wing DR, Dwek RA et al. Detection of multisulfated N-linked glycans in the L2/HNK1 carbohydrate epitope expressing neural adhesion molecule P0. *J. Neurochem*; 58:993-1000, 1992.
8. Latov N. Pathogenesis and therapy of neuropathies associated with monoclonal gammopathies. *Ann. Neurol*; 37:S32-S42, 1995.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health. (HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1999.
10. Chassande B, Leger JM, Younes-Chennoufi AB et al. Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: Correlations between M-Protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. *Mus and Nerve*; 55-62, 1998.
11. Meucci M, Baldini L, Cappellari A et al. Anti-Myelin associated glycoprotein antibodies predict the development of neuropathy in asymptomatic patients with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol*; 46:119-122, 1999.