



ImmuBlot™ Inmunoanálisis Western Blot de antiglicoproteínas asociadas a la mielina (anti-MAG)

IVD

REF 1173

20 determinaciones

Un inmunoanálisis Western Blot para la detección de anticuerpos de antiglicoproteínas asociadas a mielina (anti-MAG) y otros autoanticuerpos glicolípidos en el suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las respuestas autoinmunes del sistema nervioso periférico, conocidas como neuropatías periféricas, son manifestaciones asociadas a anticuerpos contra varios glicoconjugados neurales. Estas neuropatías pueden ser agudas, crónicas, involucrar degeneración axonal o desmielinización. Las neuropatías autoinmunes pueden dividirse en gamapatías monoclonales o polineuropatías inflamatorias policlonales como el síndrome Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), neuropatía motora multifocal (MMN) y neuropatías paraneoplásicas. En estas enfermedades, hay una importante superposición de los autoantígenos involucrados que arbitran el mecanismo patógeno. Los siguientes autoanticuerpos específicos del nervio periférico se encuentran en estas neuropatías:

1-6

- a) antiglicoproteína asociada a la mielina (MAG),
- b) antiglicolípidos ácidos como paraglobosida sulfoglucoronil (SGPG),
- c) antigangliósidos,
- d) antiproteínas asociadas a la mielina compacta como P0, P2 y proteína mielina periférica 22 (PMP22).

El epítipo (HNK1) reconocido por los autoanticuerpos MAG humanos es un oligosacárido sulfatado. Este mismo epítipo es compartido por SGPG, P0 y PMP22. Las neuropatías asociadas a anti-MAG con paraproteinemia IgM generalmente son un grupo heterogéneo de enfermedades, progresivo lentamente con evidencia de desmielinización y un grado variable de pérdida axonal usualmente asociada a la ataxia. De todos los casos de neuropatía periférica con paraproteinemia IgM, el 50% posee anticuerpos anti-MAG. Se percibe que estos autoanticuerpos pueden interferir con el proceso de mielinización, con el mantenimiento de la mielina o con las interacciones celulares de Schwann. Por consiguiente, la detección de estos autoanticuerpos es útil para el médico, ya que sugiere desmielinización activa en una neuropatía periférica.

78

El inmunoanálisis Western Blot brinda un método susceptible para la proyección y confirmación simultánea de autoanticuerpos contra varios antígenos asociados a la mielina de los nervios. Las reacciones de anti-MAG pueden observarse fácilmente a 100 kD. Si la muestra no produce inmunoreactividad en la tira de la mancha, el resultado debe informarse como negativo.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Para realizar el análisis, las tiras se incuban con el suero diluido del paciente. Los anticuerpos específicamente se adhieren a los antígenos asociados a la mielina en la tira. Luego de un lavado adecuado y un paso de incubación con conjugado IgM antihumano de cabra, se lavan e incuban las tiras con enzima-sustrato. Las reacciones positivas de anticuerpos anti-MAG aparecen en las bandas azul-violeta a 100 kD.

REACTIVOS

Almacenaje y preparación

Almacene todos los reactivos a 2-8°C. **No congelar.** No usar si los reactivos líquidos están turbios o si hay un precipitado. Antes de comenzar el estudio, los reactivos deben estar equilibrados a temperatura ambiente (~22°C). Las tiras antigénicas solo pueden usarse una vez. No intercambie los componentes de diferentes lotes. No use los reactivos pasada la fecha de vencimiento que se encuentra en las etiquetas.

Precauciones

Todos los componentes derivados de humanos usados han sido evaluados para HBsAg, HCV, HIV-1 y 2, y HTLV-I y resultaron negativos por las pruebas requeridas por la FDA de EE.UU. Sin embargo, todos los derivados de sangre humana y muestras del paciente deben considerarse potencialmente infecciosos y se deben seguir todas las prácticas de laboratorio en el almacenaje, distribución y desecho de estos materiales.

9

ES

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Luego de desechar los líquidos, descargue con mucha cantidad de agua para evitar acumulación de azida. La NaN₃ es tóxica si se ingiere. Informe los incidentes inmediatamente al director del laboratorio o al centro de control de intoxicaciones.

Siga las buenas prácticas de laboratorio para reducir la contaminación bacteriana y cruzada de reactivos.










Materiales provistos

Western Blot de anti-MAG ImmuBlot™  1173

El kit contiene suficiente reactivos como para realizar 20 determinaciones.

1 x 20	Tiras de Western Blot
1 x 120 µl	Control positivo de anti-MAG (tapa de frasco ampolla violeta)
1 x 120 µl	Control negativo (tapa de frasco ampolla amarilla).
1	Tarjeta de control
1 x 250 µl	Conjugado IgM antihumano de cabra (tapa de frasco ampolla azul)
1 x 60 ml	Diluyente de suero
1 x 25 ml	Enzima-sustrato (botella ámbar)
1 frasco ampolla	Tampón de lavado en polvo ; reconstituir a un litro con agua desionizada o destilada.
3	Placas de ensayo
2	Formularios de informes

Símbolos utilizados 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

Material requerido pero no provisto

- Cilindro graduado de 100 ml limpio
- Pinzas no dentadas
- Agitador con plataforma giratoria
- Papel absorbente o servilletas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Apriete la botella para sostener el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 10 a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Temporizador

RECOPIACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este procedimiento solo se deben usar muestras de suero. No se deben usar las muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios ya que pueden interferir en el desempeño de esta prueba. Conserve las muestras a 2-8°C no más de una semana. Para un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Notas de procedimiento

- Lea el prospecto cuidadosamente antes de comenzar con el ensayo.

ES

- Deje que las muestras de suero y los reactivos se estabilicen a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de comenzar con el procedimiento. Vuelva a colocar las muestras y los reactivos no usados en el refrigerador de inmediato luego de usarlos.
- Una técnica de lavado apropiada es crucial para el rendimiento satisfactorio del ensayo.
- Manipule las tiras con pinzas limpias únicamente. No las toque con las manos.
- Las tiras están enumeradas individualmente en la parte inferior de cada tira. Asigne números de identificación de la muestra a las tiras respectivas en el formulario de informes.
- Complete toda información relevante en el formulario de datos antes de comenzar con el ensayo.

Método de análisis

Paso 1. Con unas pinzas con punta roma, coloque el número requerido de **tiras** hacia arriba en el depósito individual de la placa de ensayo.

Paso 2. Pipetee **1.0 ml** de diluyente de suero en cada depósito.

Paso 3. Pipetee **10 µl** de control positivo y negativo y la muestra del paciente en los depósitos adecuados para obtener una **dilución de 1:101**. Incube durante **60 minutos** (± 5 min.) a temperatura ambiente en un agitador con plataforma giratoria.

Paso 4. aspire la solución de la muestra al contenedor de agua. Lave con cuidado las tiras con el tampón de lavado al rociar aproximadamente 2 ml de la solución directamente en las tiras. Lave las tiras agitándolas suavemente durante **5 minutos** y aspire la solución en el contenedor de agua. **Repita 2 veces**. *Precaución: el lavado completo de las tiras entre incubaciones es importante para obtener resultados válidos. El lavado incorrecto resultará en alta coloración del fondo.*

Paso 5. Pipetee **1.0 ml** de diluyente de suero seguido de **10 µl** de conjugado en cada depósito. Incube durante **30 minutos** (± 5 min.) a temperatura ambiente en un agitador giratorio.

Paso 6. Repita el **paso 4**.

Paso 7. Pipetee **1.0 ml** de sustrato en cada depósito e incube con agitación suave durante **10 minutos** (± 5 min.) a temperatura ambiente y luz reducida.

Paso 8. Lave con cuidado las tiras con el agua desionizada al rociar aproximadamente 2 ml de la solución directamente en las tiras. Lave las tiras agitándolas suavemente durante **5 minutos** y aspire la solución en el contenedor de agua. **Repita**.

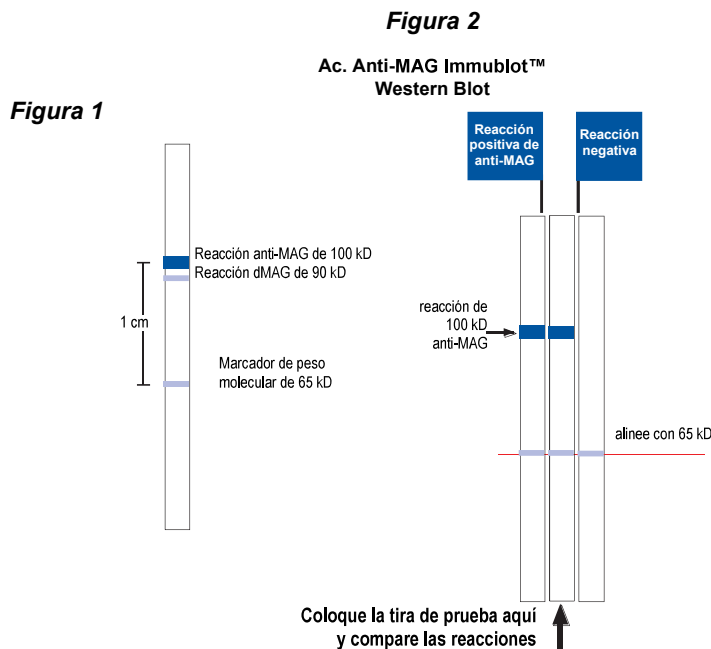
Paso 9. Con unas pinzas con punta roma, quite las tiras de la placa de ensayo y colóquelas con cuidado en el papel absorbente. Manipule solo los extremos de las tiras y déjelas secar durante **15-20 minutos**.

Control de calidad

Aunque las tarjetas de control son específicas de cada lote, los controles negativos y positivos se deben incluir en cada análisis para asegurar el rendimiento adecuado del ensayo.

Reacción de control positivo: aparecerá una banda azul violeta densa y difusa a 100 kD, (indicado en la tarjeta de control con una flecha), que representa la reacción anti-MAG. Es posible que aparezca una segunda banda directamente abajo de esta banda a 90 kD, que representa MAG (dMAG) degradado. El significado clínico de dMAG es desconocido. Además de la tira de control positivo aparecerá un marcador de alineación azul de 65 kD (*ver figura 1*).

Reacción del control negativo: la reacción del control negativo solo mostrará el marcador de alineación azul violeta de 65 kD (*ver figura 2*).



RESULTADOS

Pautas de lectura e interpretación

Las tiras ImmuBlot™ contienen glicoproteínas asociadas a la mielina de un peso molecular de 100 kD. La proteína de 65 kD sirve como marcador de peso molecular para ayudar a alinear las tiras en la tarjeta de control (ver figura 1).

- Paso 1.** Sostenga la tira con la muestra entre las tiras positivas y negativas en la tarjeta de control laminada provista y alinee la tira de prueba con el marcador de peso molecular de 65 kD como el punto de referencia (ver figura 2).
- Paso 2.** Compare la reacción de la tira de prueba con las de control en cada lado.
- Paso 3.** Si la banda de la tira de prueba se alinea con la banda de 100 kD en la tira de control positivo es una reacción anti-MAG. Dicha reacción debe considerarse positiva. Las reacciones positivas también pueden ocurrir en varias intensidades, desde débil a fuerte. Las reacciones débiles deben compararse con las intensidades de reacción de referencia en la posición correspondiente en la tira de control negativo. La figura 2 brinda un ejemplo de un resultado positivo adecuadamente alineado.
- Paso 4.** Si no hay bandas de reacción visibles y/o bandas que no corresponden a la reacción anti-MAG de 100 kD de la tarjeta de control, estos resultados deben considerarse negativos anti-MAG.

VALORES ESPERADOS

Caso de anticuerpos antinerviosos (anti-MAG) en neuropatías

10

Desórdenes	n	positivo	% positivo
Polineuropatía asociada a gammapatías IgM	40	26	65
Neuropatías desmielinizantes	33	26	78
Neuropatía axonal	6	0	0

Asociación de títulos de anticuerpos antiMAG con progresión a neuropatía clínica

11

Título de anti-MAG	sin neuropatía n=17	Subclínica n=7	Clinica confirmada n=6
Alto 1:25,000,000 a 1:100,000	1	3	3

ES

Bajo 1:6,400 a 1:200	6	2	1
Negativo <1:10	10	2	2

LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

El Western Blot de anticuerpos anti-MAG ImmuBlot™ se debe usar como una ayuda para el diagnóstico. Se pueden encontrar resultados positivos en otras condiciones autoinmunes y/o ciertas enfermedades infecciosas. Por consiguiente, los resultados deben evaluarse y ser interpretados por un médico o neurólogo teniendo en cuenta el historial clínico del paciente y otros resultados de laboratorio. Algunos sueros pueden reaccionar al marcador de peso molecular ocasionalmente. Su significado es desconocido.

GUÍA DE SOLUCIONES DE PROBLEMAS

- **Banda/s fuerte/s en tira de control negativo.** Causa probable: frasco ampolla contaminado o contaminación cruzada del depósito con suero positivo.
- **El control positivo aparece como tira de control negativo.** Causa probable: se confundió el frasco de control negativo como frasco de control positivo.
- **Las tiras están completamente blancas.** Causa probable: adición de conjugado o sustrato omitido.
- **Fondo alto y contraste débil entre las bandas y el fondo.** Causa probable: se omitieron los pasos de lavado o se realizaron incorrectamente, o se extendieron demasiado las incubaciones.

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) 1993.
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.