

## *Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa de Anticuerpos Anti-Musculo Liso en Suero, Plasma y Otros Fluidos Biológicos*

**Solo para diagnóstico In Vitro**  
**Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete**  
**Conservar entre 2°C a 8°C**

### NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de ASMA

### USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de anticuerpos anti-musculo liso en suero, plasma y otros fluidos biológicos.

### INTRODUCCIÓN

El músculo liso no es involuntario como el músculo estriado, se encuentra dentro de la capa tónica media de las arterias grandes y pequeñas y las venas, la vejiga, el útero, los tractos reproductivos masculinos y femeninos, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, erector de las vellosidades de la piel, el músculo ciliar, y el iris del ojo.

Anticuerpo anti-musculo liso son anticuerpos (inmunoglobulinas) formados contra el músculo liso. Estos anticuerpos son típicamente asociados con hepatitis autoinmune crónica.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La microplaca proporcionada en este kit ha sido previamente recubierta con un anticuerpo específico para ASMA. Se añaden los estándares o las muestras a los pocillos adecuados de la microplaca con un conjugado con biotina policlonal específico para la preparación de anticuerpos de la ASMA. A continuación, la Avidina es conjugada con la peroxidasa de rábano picante (HRP) y se añade a cada pocillo de microplaca para inmediatamente después incubarse. A continuación, una solución de sustrato TMB, se añade a cada pocillo. Sólo aquellos pocillos que contienen ASMA, conjugado con biotina, anticuerpo y avidina conjugada con enzima exhibirán un cambio de color. La reacción enzima-sustrato se termina mediante la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm  $\pm$  2nm. La concentración de ASMA en las muestras se determina posteriormente comparando la D.O. de las muestras con la curva estándar.

### REACTIVOS

#### *Materiales abastecidos con el equipo de prueba*

1. Placa de micropozos recubiertos con antígeno de anticuerpo anti-musculo liso con 96 pozos
2. Estándar de referencia (lío-filizado)
3. Diluyente de estándar
4. Reactivo de detección A
5. Reactivo de detección B
6. Diluyente de ensayo A (2x)
7. Diluyente de ensayo B (2x)
8. Sustrato TMB
9. Solución de paro

10. Concentrado de buffer de lavado (30x)
11. Instructivo

#### *Materiales requeridos pero no abastecidos*

1. Pipetas de precisión 10  $\mu$ L-100  $\mu$ L y de 100  $\mu$ L-1000  $\mu$ L
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

La solución de paro sugerida para el uso en este kit es una solución ácida. Utilice ropa de protección en ojos, manos y cara cuando utilice este material.

### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. **Suero.-** Use un tubo separador de suero y permita que las muestras coagulen durante dos horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 antes de la centrifugación durante 20 minutos a aproximadamente 1000 g. Muestras recientes ensáyelas inmediatamente o almacénelas en alícuotas a -20°C u -80°C para su uso posterior. Evite ciclos repetidos de congelación/descongelación.
2. **Plasma.-** Recolecte plasma con EDTA o heparina como anticoagulante. Centrifugue las muestras durante 15 minutos a 1000 g de 2 - 8 minutos dentro de los 30 minutos de la colección. Separe el plasma y ensáyelo inmediatamente o almacene las muestras en alícuotas a -20°C u -80 °C para su uso posterior. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación.
3. **Otros fluidos biológicos.-** Centrifugar las muestras durante 20 minutos a 1000 g. Eliminar las partículas y ensáyelas inmediatamente o guarde las muestras en alícuotas a -20°C u -80 °C para su uso posterior. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación.

### PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

- Las muestras que se utilizarán dentro de los 5 días puede ser almacenado a 2 - 8 °C, de lo contrario las muestras deben ser almacenadas a -20 °C (1 mes) ó -80°C (2 meses) para evitar perder la pérdida de bioactividad y contaminación.
- Al realizar el ensayo traer las muestras lentamente a temperatura ambiente.
- La hemólisis en la muestra influye en el resultado, de modo que muestras hemolizadas no pueden ser utilizadas en este kit.

### PREPARACION DEL REACTIVO

- Traiga a temperatura ambiente todos los componentes del kit (18 - 25°C) antes de su uso.
- **Estándar.-** Reconstituir el estándar con 1.0 mL de diluyente de estándar, dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, agitar suavemente (no espuma). La concentración del estándar en la solución madre es de 2000 U/mL. Use la solución patrón madre para



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

#### *Distribuido por:*

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.  
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria  
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México  
**Lada sin costo:** 01 800 440 0404 c/ 10 líneas  
**Tel:** 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

producir una serie de dilución. Mezclar cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia. Configure 7 puntos del estándar diluido como lo son 2,000 U/mL, 1,000 U/mL, 500 U/mL, 250 U/mL, 125 U/mL, 62.5 U/mL, 31.2 U/mL, los últimos tubos con diluyente estándar es el blanco como 0 U/mL.

- **Diluyente de ensayo A y Diluyente de ensayo B.-** Diluir 6 mL del diluyente de ensayo A o B concentrado 2x con 6 mL de agua desionizada o destilada para preparar 12 mL de diluyente de ensayo A o B. La dilución de trabajo preparado no puede ser congelado.
- **Reactivo de Detección A y B.-** Centrifugar brevemente el reactivo de detección A y B antes de su uso. Se diluye a la concentración de trabajo con diluyente de ensayo de trabajo A o B, respectivamente (1:100)
- **Solución de lavado.-** Diluir 20 mL de concentrado de buffer de lavado (30x) con 580 mL de agua desionizada o destilada para preparar 600 mL de solución de lavado (1x).
- **Sustrato TMB.-** Aspirar la cantidad necesaria de la solución con puntas esterilizadas y no volcar la solución residual en el vial de nuevo

#### NOTA IMPORTANTE

1. Preparar estándar dentro de 15 minutos antes del ensayo. Por favor, no disolver los reactivos a 37°C directamente.
2. Realizar diluciones seriadas de los pozos directamente no está permitido.
3. Por favor reconstituya los estándares, reactivo de detección de trabajo A y B de acuerdo con las instrucciones antes mencionadas, evite la formación de burbujas y mezcle suavemente hasta que los cristales se hayan disuelto completamente. Para minimizar la imprecisión causada por el pipeteo, utilice pequeñas cantidades con pipetas calibradas.
4. Los estándares así como también los reactivos de detección A y B ya reconstituidos se pueden utilizar solamente una vez.
5. Si se han formado cristales en el concentrado de solución de lavado (30x), deje atemperar la botella y mezcle suavemente hasta que los cristales se hayan disuelto completamente.

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Por favor predecir la concentración antes del ensayo. Si los valores para estos no están dentro del rango de la curva estándar, los usuarios deben determinar las diluciones de muestras óptimas para sus experimentos particulares.

1. Determinar los pozos para los estándares diluidos, blanco y muestras. Prepare 7 pozos para el estándar, y uno para el blanco. Añadir 100 µL de cada uno de los estándares diluidos (véase Preparación del Reactivo), blanco y las muestras en los pocillos correspondientes. Cubrir con el sellador de la placa. Incubar durante 2 horas a 37 °C.
2. Retire el líquido de cada pocillo, no se lava.
3. Añadir 100 µL de la solución de trabajo de Reactivo de Detección A en cada pocillo. Cubrir con el sellador de placa e Incubar 1 hora a 37 °C
4. Aspirar la solución y lavar con 400 µL de buffer de lavado (1x) cada pocillo utilizando una pipeta multicanal, dispensador múltiple o lavador automático. Repita y deje reposar durante 1~2 minutos. Retire el líquido restante de todos los pocillos completamente y seque la placa finalmente sobre un papel absorbente. Repita 3 veces. Después del último lavado, eliminar cualquier resto de buffer de lavado por aspiración o decantación.
5. Añadir 100 µL de la solución de trabajo de Reactivo de Detección B en cada pocillo. Cubrir con el sellador de placa e Incubar 30 minutos a 37 °C
6. Repetir el proceso de aspiración/lavado cinco veces llevadas a cabo

en el paso 4.

7. Añadir 90 µL de solución de sustrato a cada pocillo. Cubra con una tapa para placas nuevas. Incubar durante 15-25 minutos a 37 °C (No exceder de 30 minutos). Proteger de la luz. El líquido se volverá azul mediante la adición de solución de sustrato.
8. Añadir 50 µL de Solución de Paro a cada pocillo. El líquido se vuelve amarillo por la adición de solución de parada. Mezclar el líquido tocando el lado de la placa. Si el cambio de color no aparece uniforme, golpee suavemente la placa para asegurar una buena mezcla.
9. Eliminar cualquier gota de agua y la huella digital en la parte inferior de la placa y confirmar que no haya burbujas en la superficie del líquido. A continuación, ejecute el lector de microplacas y realice la medición a 450 nm inmediatamente.

#### NOTA IMPORTANTE

1. **Preparación muestra:** Mantener un número adecuado de tiras para un experimento y retirar las tiras adicionales de la placa de microtitulación. Tiras no utilizadas deberán almacenarse a 4 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
2. **Las muestras o reactivos de adición:** Utilice el estándar recién preparado. Añada con cuidado las muestras a los pocillos y agitar suavemente para evitar la formación de espuma. Toque el pozo lo menos posible de las paredes. Para cada paso en el procedimiento, el tiempo total de dispensación para la adición de reactivos o muestras de la placa de ensayo no debe exceder de 10 minutos. Con esto, asegura el mismo tiempo transcurrido para cada paso de pipeteado, sin interrupción. La duplicación de los estándares y muestras, aunque no es necesario, se recomienda para evitar contaminación cruzada, el cambio de puntas de pipeta entre cada adición a nivel estándar, entre las adiciones de muestras y entre las adiciones de los reactivos. Asimismo, el uso separado de reservorios para cada reactivo.
3. **Incubación:** Para asegurar resultados exactos, se recomienda cubrir con la cubierta adhesiva a la placa durante los pasos incubación. No permita que los pozos estén descubiertos durante largos períodos en las etapas de incubación. Una vez que los reactivos se han añadido a las tiras, NO deje que las tiras se sequen en cualquier momento durante el ensayo. Los tiempos de incubación y temperatura deben ser vigilados.
4. **Lavado:** El procedimiento de lavado es crítico. La eliminación completa de líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después del último lavado, eliminar cualquier restante del buffer de lavado por aspiración o decantación y eliminar cualquier gota de agua y la huella digital en la parte inferior de la placa. Un lavado insuficiente resultará en una precisión pobre y falsa y una lectura de la absorbancia elevada.
5. **El control de tiempo de reacción:** Observe el cambio de color después de la adición del sustrato TMB (observación por ejemplo una vez cada 10 minutos), si el color es demasiado profundo, añadir Solución de paro con anticipación para evitar una reacción excesivamente fuerte que dará como resultado una lectura de la absorbancia incorrecto.
6. **Sustrato TMB** se contamina fácilmente. Por favor, protegerlo de la luz.

#### CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Promedie las lecturas duplicadas para cada estándar, control y muestras y restar la media de la densidad óptica del estándar cero. Crear una curva estándar mediante la reducción de los datos utilizando software informático capaz de generar una curva logística de cuatro parámetros (4-PL). Como alternativa, construir una curva estándar trazando la absorbancia

media para cada estándar sobre el eje X frente a la concentración en el eje Y, y dibujar una curva de mejor ajuste a través de los puntos en la gráfica. Los datos pueden ser linealizados trazando el logaritmo de las concentraciones de ASMA frente al log de la D.O. y la línea de mejor ajuste se puede determinar por análisis de regresión. Se recomienda utilizar algún software relacionado para hacer este cálculo, tal como curva experto 13.0. Este procedimiento producirá un ajuste adecuado pero menos preciso de los datos. Si las muestras se han diluido, la concentración leída de la curva estándar debe multiplicarse por el factor de dilución

#### RANGO DE DETECCIÓN

31.2–2,000 U/mL. Las concentraciones de la curva estándar que utilizadas en esta ELISA fueron 2,00 U/mL, 1,000 U/mL, 500 U/mL, 250 U/mL, 125 U/mL, 62.5 U/mL, 31.2 U/mL.

#### SENSIBILIDAD

La dosis mínima detectable de ASMA humano es típicamente menos de 7.8 U/mL. La sensibilidad de este ensayo, o límite inferior de detección (LLD) se definió como la menor concentración de proteína que podría ser diferenciada de cero. Se determinó la media del valor de D.O. de 20 replicados de estándar cero añadido por sus tres desviaciones estándar.

#### ESPECIFICIDAD

Este ensayo presenta una alta sensibilidad y especificidad para la detección excelente de anticuerpos ASMA humano. No existe reactividad cruzada significativa

#### REFERENCIAS

1. Alvarez F, et al. *International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J of Hepatology* 31:929-938, 1999.
2. Anderson P, et al. *Studies on the specificity of smooth-muscle antibodies. Clin Exp Immunol* 26:57-66, 1976.
3. Bottazzo GF, et al. *Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. J Clin Pathol* 129:403-410, 1976.
4. George, J and Shoenfeld Y. *Actin Autoantibodies, p10-12 in Autoantibodies by JB Peter and Y Shoenfeld eds. Elsevier, Amsterdam, 1996.*
5. Bretherton L, et al. *Elisa assay for IgG autotantibody to G-actin: comparison of chronic active hepatitis and acute viral hepatitis. Clin Exp Immunol* 51: 611-616, 1983.
6. DeScheerder I, et al. *Post-Cardiac injury syndrome and an increased humoral immune response against the major contractile proteins (actin and myosin). Am J Cardiol* 56:631-633, 1985.
7. Kurki P, et al. *Smooth muscle antibodies of actin and nonactin specificity. Clin Immuno Immunopathol* 9:443-453, 1978.
8. Toh BH, et al. *Viral infections and IgM autoantibody to cytoplasmic intermediate filaments. Clin Exp Immunol* 37:76-82, 1979.
9. Dighiero G, et al. *Sera with high levels of antismooth muscle and anti mitochondrial antibodies frequently bind to cytoskeletal proteins. Clin Ept Immunol* 82:52-56, 1990.
10. Toh BH. *Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. Clin Exp Immunol* 38:621-628, 1979.
11. Fusconi M, et al. *Anti-actin antibodies: a new test for an old problem? J Immunol Methods* 130:1-8, 1990.
12. Homborg J, et al. *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsomal antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology* 7:1333-1339, 1987

**Diagnóstica**  
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

**FABRICADO POR:**  
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS  
1155 CHESS DRIVE No. 121  
FOSTER CITY, CA 94404 USA