


COD 44136 16 determinaciones	COD 44536 48 determinaciones
COD 44722 12 x 	
CONSERVAR A 2-8°C	
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-gliadina Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

ANTI-GLIADIN ANTIBODIES (AGA)



ANTICUERPOS ANTI-GLIADINA (AGA) RIÑÓN DE RATA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-gliadina (AGA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en la sección de riñón de rata previamente tratada con gliadina (gliadina se une selectivamente a las fibras de reticulina). 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^{1,2}.

CONTENIDO

	COD 44136	COD 44536
A. Portaobjetos	4 x 4 pocillos	12 x 4 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Control Positivo AGA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	1 x 2,5 mL	1 x 2,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 4	1 x 12
G. Concentrated Gliadin	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL

COD 44722	
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Secciones de riñón de rata (RK-AGA) en cada pocillo.
- 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 Positivo AGA:** Suero humano con anticuerpos anti-gliadina (AGA), azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. 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.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje: Glicerol 78%, fosfato de sodio 6 mmol/L, fosfato de potasio 1,6 mmol/L, cloruro de sodio 60 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante.**
- G. Concentrated Gliadin.** Gliadina concentrada: solución de gliadina 1,5 g/L.

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 de tejido.

REACTIVOS AUXILIARES

- Cod 44136 y 44536 no precisan de reactivos auxiliares.
- Cod 44722 precisan de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
- B. PBS (10x).**
- D. FITC/Evans (R),** conjugado con contratiñón de azul de Evans, o **FITC (R),** conjugado sin contratiñón de azul de Evans.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
- G. Concentrado de Gliadina.**
- 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.

Gliadina: Diluir el Reactivo G añadiendo 5 mL de agua destilada. Estable tres meses a 2-8°C (Nota 1).

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 1/40 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 1/40.

PROCEDIMIENTO

- Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
- Depositar una gota (50 µL) de gliadina en cada pocillo, procurando cubrirlo perfectamente (Nota 2).
- Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

- Lavar minuciosamente el portaobjetos por inmersión en una bandeja de lavado llena de PBS durante 5 minutos (ver preparación de los reactivos). 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 (50 µL) de la muestra diluida o del Control en cada pocillo asegurándose de cubrirlos completamente.
- Incubar como en el paso 3.
- 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. (Nota 3).
- Lavar (paso 4) y secar (paso 5).
- 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 (paso 4) y secar (paso 5).
- 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 de tejido. La intensidad de marcaje de la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

Los sueros que presentan un marcaje fluorescente en las zonas periglomerular y peritubular del riñón de rata a las diluciones recomendadas deben ser considerados positivos. No se observa marcaje en los túbulos renales y los glomérulos.

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 (+) y el Control Negativo (-) suministrados con los kits cod 44136 y cod 44536 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo (+) debe proporcionar el marcaje específico descrito 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

Los conjugados FITC/Evans (R) y FITC (R) están calibrados frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo AGA está verificada frente a un suero humano de referencia interno.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de altos niveles de anticuerpos anti-gliadina (AGA) indica enfermedad celíaca. La sensibilidad de los anticuerpos AGA para la enfermedad celíaca está entre el 95-100%. Los anticuerpos AGA tipo IgG son más sensibles pero menos específicos y los AGA de tipo IgA son menos sensibles pero más específicos. Los anticuerpos AGA se detectan también en dos terceras partes de pacientes con dermatitis herpetiforme.³

Los pacientes con enfermedad Celíaca con deficiencia selectiva de IgA sólo pueden ser detectados midiendo los AGA de tipo IgG.

El kit BioSystems anticuerpos anti-gliadina fue usado con 82 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes así como donadores sanos. Los resultados aparecen a continuación:

Pacientes	n	BioSystems AGA- IFA		BioSystems AGA-EIA	
		Positivo	Negativo	IgG EIA Positivo	IgA EIA Positivo
Enfermedad Celíaca	42	42	0	42	30
Otras enfermedades autoinmunes	20	0	20	-	-
Controles sanos	20	0	20	2	0

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

Puede haber cierta turbidez en la solución de gliadina sin ningún efecto aparente en el resultado final del ensayo.

Evitar tocar el tejido fijado en los pocillos durante todo el procedimiento.

Utilizar un frasco lavador o pipeta para el lavado del portaobjetos, 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.
- Unsworth DJ et al. New Immunofluorescent blood test for gluten sensitivity. Archives of Disease in Childhood, 1981; 56: 864-868.
- Catassi C. Gliadin antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.