


| |
|---|
| COD 44574 12 x  |
| CONSERVAR A 2-8°C |
| Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-córtex adrenal Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico |

ANTI-ADRENAL CORTEX ANTIBODIES (AAC)



ANTICUERPOS ANTI-CÓRTEX ADRENAL (AAC)

Inmunofluorescencia indirecta
ADRENAL DE MONO

FUNDAMENTO DEL METODO

Los anticuerpos anti-córtex adrenal (AAC) del suero se unen a su correspondiente antígeno presente en la glándula adrenal de mono. El complejo antígeno-anticuerpo resultante se detecta mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualiza mediante microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

COD 44574

| | |
|-----------------|-----------------|
| A. Portaobjetos | 12 x 4 pocillos |
|-----------------|-----------------|

COMPOSICIÓN

A. Portaobjetos. Secciones de adrenal de mono en cada pocillo.

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 material particulado, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en la sección del tejido.

REACTIVOS AUXILIARES

- Cod 44574 precisa de los siguientes reactivos auxiliares que pueden adquirirse de forma separada:
 - 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.
 - D. IgG FITC/Evans (M).** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y adsorbidos con suero de mono. Azul de Evans 0,01 g/L y 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.
- Los Controles pueden adquirirse de forma separada:
 - C+. Control Positivo AAC:** Suero con anticuerpos anti-córtex adrenal, azida de sodio 0,95 g/L.
 - C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.

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 1/4 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 1/4.

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 que el tejido esté cubierto 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.
- Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado. (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
- 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 5) y secar (ver paso 6).
- 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 no es representativa de la preparación.

Los sueros que presenten un marcaje fluorescente del citoplasma de las células del córtex adrenal a la dilución recomendada deben considerarse positivos para anticuerpos anti-córtex adrenal.

Las muestras positivas pueden titularse.

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 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 IgG FITC/Evans (M) está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas IgG humanas de oveja conjugadas con FITC.
- Los resultados obtenidos con el kit AAC de BioSystems en un estudio comparativo no muestran diferencias sistemáticas significativas con un radioinmunoanálisis de anticuerpos anti-21 hidroxilasa. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- La especificidad del Control Positivo AAC ha sido verificada frente a un suero humano de referencia interno

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La inmunofluorescencia indirecta es el método convencional para la determinación de anticuerpos anti-córtex adrenal (AAC).

La presencia de anticuerpos contra el citoplasma de células de córtex adrenal (AAC) es fuertemente indicativa de enfermedad de Addison, una alteración poco común debida a la deficiencia de hormonas adrenocorticales. Casi todos los individuos con amenorrea primaria y enfermedad de Addison tienen niveles detectables de anticuerpos contra el citoplasma de las células del córtex adrenal. Estos autoanticuerpos son marcadores útiles para la predicción del desarrollo de la enfermedad de Addison^{2,3}.

El kit de anticuerpos Anti-Córtex Adrenal de BioSystems se utilizó en la determinación de 170 sueros de una variedad de pacientes con enfermedad de Addison así como de donantes sanos. Los resultados se describen a continuación, y muestran una sensibilidad y especificidad del 94,5% y 100%, respectivamente.

| Pacientes | n | AAC BioSystems | |
|-----------------------|----|----------------|----------|
| | | Positivo | Negativo |
| Enfermedad de Addison | 92 | 87 | 5 |
| Controles sanos | 78 | 0 | 78 |

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 el tejido del pocillo durante todo el procedimiento.
- Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Hoek A, Wulfraat NM and Drexhage HA. Steroid cell autoantibodies. En: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996
- Ten S, New M, Maclaren N. Clinical R. Addison's Disease. Clinical Review. J Clin Endocrinol Metab 2001; 88: 2909-2922.