



ANTI-KERATIN ANTIBODIES (AKA)

COD 44618 48 determinaciones	COD 44517 12 x
CONSERVAR A 2-8°C	
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-queratina Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

ANTICUERPOS ANTI-QUERATINA (AKA)

Inmunofluorescencia Indirecta
ESOFAGO DE RATA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-queratina del suero (AKA) se unen a la filagrina presente en el corte de esófago de rata (tercio medio). Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas G humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

COD 44618	
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans (R, CL)	1 x 3 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 12

COD 44517	
A. Portaobjetos	12 x 4 pocillos

COMPOSICION

- A. Portaobjetos:** Cortes de esófago de rata (tercio medio).
- 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 Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans (R, CL):** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), 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.**

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 el cultivo de células.

REACTIVOS AUXILIARES

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans (R, CL),** conjugado con contratinción de azul de Evans.

E. Mounting Medium. Medio de Montaje.

C+. Control Positivo: anticuerpos anti-queratina (AKA).

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.

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 1/10 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 1/10.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (50 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
8. 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.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. 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 en la parte interior de la sección del tejido. La intensidad de marcaje en la periferia del tejido no es representativa de la preparación.

La observación de marcaje fluorescente lineal laminado a lo largo del epitelio escamoso queratinizado del epitelio del esófago de rata a la dilución recomendada indica un resultado positivo. Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cuando no se observa el marcaje específico descrito, el resultado es negativo para el autoanticuerpo indicado.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (C+) y el Control Negativo (C-) 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

El conjugado IgG FITC/Evans (R, CL) está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La filagrina presente en el epitelio del esófago de rata y reconocida por los anticuerpos anti-queratina (AKA), es extremadamente sensible a los cambios de temperatura y puede perder su antigenicidad cuando los portaobjetos no son refrigerados adecuadamente (2-8°C) durante su transporte o almacenamiento.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-queratina (AKA) es fuertemente indicativa de artritis reumatoide. La sensibilidad diagnóstica para esta enfermedad varía entre el 30 y el 87%, y la especificidad, entre el 90 y 99%, dependiendo del diseño del estudio y del método utilizado. Los AKA también se encuentran en un tercio de los pacientes de artritis reumatoide con factores reumáticos negativos ^{2,3}.

El kit BioSystems de anticuerpos anti-queratina fue usado con 177 sueros de pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades conectivas. Los resultados mostraron una especificidad del 95% y una sensibilidad del 30,4% para la artritis reumatoide.

<i>Enfermedad</i>	<i>n</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Artritis reumatoide (AR)</i>	123	38	49
<i>AR en tratamiento</i>	5	1	4
<i>Sospecha de AR</i>	12	0	12
<i>Otras enfermedades conectivas</i>	37	2	35

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

NOTAS

1. Evitar tocar el tejido fijado en el pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para lavar los pocillos, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. Br Med J 1979; 2 (6182): 97-99.
3. Conrad K, Schössler W, Hiepe F. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. A diagnostic reference. In: Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity, vol. 2. Conrad K and Sack U eds. 2002