



# ImmuGlo™ Anti-Adrenal Cortex Antibody (AcAb) Test

IVD

PRODUCT INSERT

Code 1171 48 Determinations

## INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-adrenal cortex antibodies in human serum.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Addison's disease is an endocrine disorder that occurs in all age groups. The disease is characterized by weight loss, muscle weakness, fatigue, low blood pressure and skin pigmentation. Most cases of Addison's disease are caused by the destruction of the adrenal cortex. About 70% of cases of Addison's disease are autoimmune mediated, while tuberculosis accounts for 20% and 10% are due to less common causes such as chronic infections, amyloidosis, metastatic neoplasia, and surgical removal of the adrenal gland<sup>1</sup>. Major clinical manifestations of Addison's disease (anorexia, abdominal pain, wasting, apathy, weakness, fasting hypoglycemia, diminished ability to conserve sodium and excrete free water, hyponatremia, increased production of ACTH, and  $\beta$ 2 lipoprotein) are attributable to deficiencies of cortisol and aldosterone<sup>2</sup>.

The diagnosis of Addison's disease is first made by biochemical methods to detect insufficient levels of cortisol followed by methods to establish the cause. Of such methods (which include the ACTH stimulation test, insulin induced hypoglycemia test and x-ray exams) the autoantibody test for the presence of antibodies to adrenal cortex is of prime significance as over 70% of patients with Addison's disease have autoimmune etiology. Indirect immunofluorescence (IF) on human or primate adrenal-cortex provide a simple, precise, and reliable method of detecting autoantibodies in Addison's disease<sup>3-6</sup>. Adrenal cortex antibodies (AcAb) are present in greater than 90% of patients with recent-onset autoimmune Addison's disease. AcAb are also markers of potential Addison's disease.

## PRINCIPLES OF PROCEDURES

Antibodies to the adrenal cortex are detected by indirect immunofluorescence (IF) using a primate adrenal substrate. In this IFA method, patient serum is incubated on tissue sections to allow binding of antibodies to the specific antigens of the substrate. Any immunoglobulins and other serum proteins not bound to the tissue sections are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of AcAb is determined by a specific apple-green reaction of the adrenal cortical cell cytoplasm. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is determined by testing serial dilutions<sup>7</sup>.

## PRODUCT INFORMATION

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

### Materials Provided

ImmuGlo™ Anti-Adrenal cortex Antibody Test Kit **REF** 1171

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	<b>6 well Primate Adrenal Cortex Substrate Slides</b>
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>ADR</b> *	<b>Adrenal Antibody Positive Control.</b> Contains human serum.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Negative Control.</b> Contains human serum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>Anti-human IgG FITC Conjugate.</b> Protect from light.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Buffered Diluent.</b>
2 vials	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Phosphate Buffered Saline (PBS).</b> Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	<b>Mounting Medium.</b> Do not freeze.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Evan's Blue Counterstain.</b>
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	<b>Coverslips</b>

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materials Required But Not Provided

Fluorescence microscope  
Micropipette or Pasteur pipette  
Serological pipettes  
Staining dish (e.g. Coplin jar)  
Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack  
Distilled or deionized water  
1 liter container  
Wash bottle  
Paper towels  
Incubation chamber

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>14</sup>.

WARNING - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

## **SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## **PROCEDURE**

### **Test Method**

#### **A. Screening**

1. Dilute each patient serum 1:4 with the Sample Diluent provided (0.1 ml serum + 0.3 ml Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

### B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:4. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

#### Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.3 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 4. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4
Serum	0.1 ml +			
Buffered Diluent	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:4	1:8	1:16	1:32 etc.

### QUALITY CONTROL

Both a positive and negative control serum should be included with each test run. The negative control should show no specific fluorescence, whereas the positive control should have 2+ or greater staining intensity.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include : improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

### RESULTS

The anti-adrenal cortex antibody test should be reported as negative, or positive with titer. Read for specific staining of the adrenal cortical cell cytoplasm.

Various other tissue antibodies, such as anti-nuclear (ANA), anti-mitochondrial (AMA), anti-smooth muscle (ASMA), anti-endothelial antibodies (EMA) may also be observed on primate adrenal gland substrate. Sera exhibiting these reactions should be reported negative for anti-adrenal antibodies (see photo 1 at the end of this document).

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Different staining patterns can be observed. Most sera stain the whole cortex with brighter apple-green fluorescence of the glomerulosa zone. A few sera react only on the fasciculata and reticularis zones.



# ImmuGlo™ Anti-Surrénal Anticorp (AcAb)

IVD

REF

1171

48 Determinations

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-cortex surrénal dans le sérum humain.

## GENERALITES

La maladie d'Addison est un désordre endocrinien qui se produit dans toutes les catégories d'âge. La maladie est caractérisée en poids perte, faiblesse de muscle, fatigue, hypotension et pigmentation de peau. La plupart des cas de la maladie d'Addison sont provoqués par la destruction du cortex adrénal. Environ 70% de cas de la maladie d'Addison sont autoimmuns, alors que la tuberculose représente 20%. 10% de cas sont dus aux causes moins communes telles que des infections chroniques, l'amyloidosis, la néoplasie métastatique, et le déplacement chirurgical de la glande adrénale<sup>1</sup>. Les manifestations cliniques principales de la maladie d'Addison (anorexie, douleur abdominale, gaspillage, apathie, faiblesse, hypoglycémie de jeûne, capacité diminuée de conserver le sodium et d'excréter l'eau libre, le hyposodium, la plus grande production des ACTHS, et la  $\beta$ 2 lipoprotéine) peuvent résulter du manque du cortisol et de l'aldostérone<sup>2</sup>.

Le diagnostic de la maladie d'Addison est d'abord fait par les méthodes biochimiques qui détectent les niveaux insuffisants du cortisol suivis des méthodes qui établissent la cause. Cet essai pour la présence d'AAcAb est de grande importance car plus de 70% de patients présentant la maladie d'Addison ont le type autoimmun.

L'immunofluorescence indirecte (IF) sur le cortex adrénal d'humain ou de primate fournissent une méthode simple, précise, et fiable de détecter des autoanticorps dans la maladie d'Addison<sup>3-6</sup>. Les anticorps de cortex adrénal (AcAb) sont présents dans 90% plus grand que de patients d'Addison autoimmune de début récent. AcAb sont également des marqueurs de la maladie d'Addison potentielle.

## PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des sections de tissu, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué humaine, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG. Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme de la cytoplasme cortex surrénale montre la présence d'AAcAb. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives<sup>14</sup>.

## INFORMATION PRODUIT

### Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2° et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

## Matériel fourni

ImmuGlo™ AcAb IFA REF 1171

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 déterminations chacune.

8x	<b>SORB SLD 6</b>	<b>Lames 6 puits de cortex surrénale</b>
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL + ADR</b> *	<b>Contrôle positif AcAb</b> , sérum humain
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Contrôle négatif</b> , sérum humain
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> *	<b>Conjugué FITC anti-IgG</b> humaines. Maintenir à l'abri de la lumière
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Diluant sérum</b> , avec de la BSA
2 vials	<b>BUF WASH</b>	<b>Tampon phosphate salin (PBS)</b> . Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	<b>Milieu de montage</b> . Ne pas congeler
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Contre colorant Bleu d'Evans</b>
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	<b>Lamelles couvre-lames</b>

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

## Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence  
Micropipette ou pipette Pasteur  
Pipette sérologique  
Bac à coloration pour le lavage des lames  
Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir  
Eau distillée ou déionisée  
Eprouvette graduée 1l  
Flacon pour solution de lavage  
Serviettes en papier  
Chambre d'incubation

## MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti VIH1, anti VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>14</sup>.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

## PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Éviter les congélations/décongelations successives des sérums.

## MODE OPÉRATOIRE

### A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:4 dans le diluant échantillon fourni (0,1ml de sérum + 0,3 ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits #2. Éviter de déborder des puits.
5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Éviter de déborder les puits.
6. Recouvrir la chambre humide et incubé les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un béccher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une lame du bac. Éliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
10. Recouvrir la chambre humide et incubé 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un béccher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.  
REM: Un lavage incorrect peut causer la fluorescence de fond élevé.
12. Retirer une lame du bac. Éliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité à 2-8°C.

## B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:4. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

### Préparation des dilutions en série.

Numeroter 6 tubes de 1 à 6. Ajouter 0.3ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 0.1ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Sérum</b>	<b>0,1 ml</b>			
	<b>+</b>			
<b>Diluant</b>				
<b>Echantillon</b>	<b>0,3 ml</b>	<b>0,2 ml</b>	<b>0,2 ml</b>	<b>0,2 ml</b>
		↻	↻	↻
<b>Transfert</b>		<b>0,2 ml</b>	<b>0,2 ml</b>	<b>0,2 ml</b>
<b>Dilution finale</b>	<b>1:4</b>	<b>1:8</b>	<b>1:16</b>	<b>1:32 etc.</b>

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente spécifique, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à:

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'essai d'AAcAb devrait être rapporté en tant que négatif ou positif avec le titre. Lu pour la souillure spécifique du cytoplasme cortical cellule adrénal.

On peut également observer de divers autres anticorps de tissu, une telle ANA , AMA, ASMA et EMA sur ce substrat. Des sérums montrant ces réactions devraient être rapportés le négatif pour des AcAb (voir la photo 1 pour une réaction positive d'AAcAb à la fin de ce document).

### LIMITES D'UTILISATION

On peut observer différents modèles de souillure. La plupart des sérums souillent le cortex entier avec la fluorescence vert clair de la zone de glomerulosa. Quelques sérums réagissent seulement sur les zones en trousseau et de reticularis.



# ImmuGlo™ Anti-Córtex Suprarrenal Anticuerpo (AcAb) Test

IVD

REF

1171

48 Determinations

Test de inmunofluorescencia indirecta para la detección y semicuantificación de los anticuerpos Anti-Córtex Suprarrenal (AcAb) en el suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La enfermedad de Addison es un desorden de la endocrina que ocurre en todas las categorías de edad. La enfermedad es caracterizada por pérdida del peso, la debilidad del músculo, la fatiga, la tensión arterial baja y la pigmentación de la piel. La mayoría de los casos de la enfermedad de Addison son causados por la destrucción de la corteza suprarrenal. Los cerca de 70% de casos de la enfermedad de Addison son autoinmunes, mientras que la tuberculosis considera el 20%. los 10% de casos son debido a las causas menos comunes tales como infecciones crónicas, amilosis, neoplasia metastática, y retiro quirúrgico de la glándula suprarrenal<sup>1</sup>. Las manifestaciones clínicas importantes de la enfermedad de Addison (anorexia, dolor abdominal, el perder, apatía, debilidad, hipoglucemia de ayuno, capacidad disminuida de conservar el sodio y de excretar el agua libre, el hiponatremia, la producción creciente de ACTH, y la  $\beta$ 2 lipoproteína) pueden resultar de la carencia del cortisol y de la aldosterona<sup>2</sup>.

La diagnosis de la enfermedad de Addison primero es hecha por los métodos bioquímicos que detectaron los niveles escasos del cortisol seguidos por los métodos que establecen la causa. Esta prueba para la presencia de AcAb está de gran significación pues más los de 70% de pacientes con la enfermedad de Addison tienen el tipo autoinmune.

La inmunofluorescencia indirecta (IF) en la suprarrenal-corteza del ser humano o del primate proporciona un método simple, exacto, y de confianza de detectar autoanticuerpos en la enfermedad de Addison<sup>3-6</sup>. Los anticuerpos de la corteza suprarrenal (AcAb) están presentes en mayor el de 90% de pacientes con la enfermedad de Addison autoinmune del inicio reciente. AcAb es también marcadores de la enfermedad de Addison potencial.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en un substrato suprarrenal del primate y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al substrato. Cualquier anticuerpo no unido se elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del substrato con un conjugado antihumano marcado con fluoresceína. Las reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de AcAb se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde en la citoplasma cortical suprarrenal de la célula. Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas<sup>14</sup>.

## INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

### Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

### Materiales Suministrados

ImmuGlo™ AcAb IFA REF

1171

El kit contiene los suficientes reactivos para realizar 48 determinaciones.

8x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	<b>Portaobjetos de 6 pocillos</b> con substrato <b>AcAb</b> .
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>ADR</b> *	<b>Control positivo de AcAb</b> , suero humano
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Control negativo</b> , suero humano
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana</b> con BSA. Proteger de la luz
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Diluyente de la muestra</b> con BSA
2 viales	<b>BUF WASH</b>	<b>Fosfato salino tamponado (PBS)</b> . Disolver cada vial en 1 litro
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	<b>Medio de preparación</b> . No congelar
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Colorante de contraste azul de Evans</b>
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	<b>Cubreobjetos</b>

\* PRECAUCIÓN - Contiene <0.1% NaN<sub>3</sub>

### Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia  
Micropipetas o pipeta Pasteur  
Pipetas serológicas  
Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)  
Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo  
Agua destilada o desionizada  
Envase de 1 litro  
Frasco de lavado  
Toallas de papel  
Cámara de incubación

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero

y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material <sup>14</sup>.

**PRECAUCIÓN** - La azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

### **OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Método de ensayo**

##### **A. Detección sistemática**

1. Diluir 1:4 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,1 ml de suero + 0,3 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ ) del Control Negativo en el pocillo n° 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo n° 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ ) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ ) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.

10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede aumentar fluorescencia del fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidesfijamiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

#### B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 5- 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:4. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

#### Preparación de las diluciones seriadas

Numerar 6 tubos del 1 al 6. Añadir 0,3 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,1 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,1 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇌	⇌	⇌
Transferencia		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:4	1:8	1:16	1:32 etc.

#### CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden

incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.

- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

#### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

La prueba de AcAb se debe divulgar como negativa o positivo con título. Leído para mancharse específico del citoplasma cortical suprarrenal de la célula.

Los anticuerpos otros del tejido fino, tal ANA, AMA, ASMA y EMA se pueden también observar en este sustrato. Los sueros que exhiben estas reacciones se deben divulgar la negativa para los anticuerpos anti-suprarrenales (véase la foto 1 para una reacción positiva de AcAb en el extremo de este documento).

#### **LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Diversos patrones que se manchan pueden ser observados. La mayoría de los sueros manchan la corteza entera con la fluorescencia verde intenso de la zona del glomerulosa. Algunos sueros reaccionan solamente en las zonas fasciculate y de los reticularis.



# ImmuGlo™ Anti-Nebennierenerinde Antikörper (AcAb)

IVD

REF

1171

48 Determinations

Für den Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von Anti-Nebennierenerinde Antikörper (EMA) mit der indirekten Immunfluoreszenz.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Krankheit Addisons ist eine Drüsenstörung, die in allen Altersklassen auftritt. Die Krankheit wird nach Gewicht Verlust, Muskelschwäche, Ermüdung, niedriger Blutdruck und Hautpigmentation gekennzeichnet. Die meisten Fälle von der Krankheit Addisons werden durch die Zerstörung der adrenalen Rinde verursacht. Ungefähr 70% von Fällen von der Krankheit Addisons sind autoimmun, während Tuberkulose 20% erklärt. 10% von Fällen liegen an den weniger allgemeinen Ursachen wie chronischer Infektion, Amyloidosis, metastastisch Neoplasma und chirurgischem Abbau der Nebenniere<sup>1</sup>. Klinische hauptsächlichäusserungen von Krankheit Addisons (Magersucht, Abdominal-Schmerz, Vergeuden, Apathie, Schwäche, fastendes Hypoglykämie, verminderte Fähigkeit, Natrium zu konservieren und freies Wasser, Hyponatremia, erhöhte Produktion der ACTHS und  $\beta$ 2 Lipoprotein auszuschleiden) können aus Mangel an Cortisol und Aldosteron resultieren<sup>2</sup>. Die Diagnose von Krankheit Addisons wird zuerst durch biochemische Methoden gebildet, die unzulänglichen Niveaus des Cortisols gefolgt von den Methoden ermitteln, die Ursache herstellen. Krankheit Addisons eine zu bestimmen verwendet zuerst biochemische Methoden die unzulängliche Niveaus des Cortisols ermitteln. Dieses wird vom Methoden gefolgt, das die Ursache der niedrigen Cortisolniveaus herstellen. Indirekte Immunofluoreszenz (IF) auf Mensch oder Primas Nebennierenrinde liefern eine einfache, exakte und zuverlässige Methode des Ermitteln von von Autoantikörpern Krankheit Addisons<sup>3-6</sup>. Antikörper der Nebennierenrinde (AcAb) sind in grösser als 90% von Patienten mit kürzlich Angriff autoimmuner Krankheit Addisons anwesend. AcAb sind auch Markierungen von möglicher Krankheit Addisons.

## TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenseren auf einem adrenalen Substrat des Primas inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation der Substrat mit Fluorescein-markiertem anti-Human nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von AcAb zeigt sich durch eine apfelgrüne vom adrenalen kortikalen Zelle Zytoplasmas rollt zusammen Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung), die eine positive.

## PRODUKTINFORMATION

### Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

### In der Testpackung vorhandenes Material

ImmuGlo™ AcAb IFA **REF** 1171

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 48 Ermittlungen jede durchzuführen.

8x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	<b>Objektträger zu 6 Auftragstellen beschichtet mit AcAb.</b>
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>ADR</b> *	<b>AcAb Positive Kontrolle,</b> Humanserum mit BSA
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Negative Kontrolle,</b> Humanserum mit BSA
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG</b> mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Probendiluent</b> mit BSA
2 vials	<b>BUF WASH</b>	<b>Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS).</b> Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	<b>Eindeckmittel.</b> Nicht einfrieren
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Evans Blau Färbemittel</b>
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	<b>Deckgläschen</b>

\* enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Zusätzlich benötigtes Material

Fluoreszenzmikroskop  
Mikropipetten oder Pasteurpipetten  
Kolbenhubpipette  
Färbetrog (z.B. nach Coplin)  
Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende Gestelle  
Destilliertes oder entionisiertes Wasser  
Behälter, 1 Liter  
Papierhandtücher  
Feuchte Kammer

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humansen und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und

Richtlinien zu lagern und zu beseitigen <sup>14</sup>.

ACHTUNG - Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

## PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

### Testmethode

#### A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probendiluent aus dem Kit 1:4 (0,1ml Serum + 0,3 Diluent) verdünnen. Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
6. Die Objektträger in der abgedeckten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragstelle ausdrücken.
9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
10. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann Hintergrundfluoreszenz erhöhen.
12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen

- ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 3 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf Deckgläschen gleichmäßig geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken **und seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
  14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
  15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

## B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der Schritte 5 bis 13 der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:4-Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

### Herstellung einer Reihenverdünnung

6 Röhrrchen mit 1 bis 6 beschrifteten. Vom Probendiluent 0,3 ml in Röhrrchen 1 und jeweils 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 4 geben. 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 0,2 ml ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen in das nächste überführt werden.

Röhrrchen	1	2	3	4
Serum	0,1 ml			
	+			
Probendiluent	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Zu überführen		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:4	1:8	1:16	1:32 etc.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz zeigen. Sollte die positive Kontrolle eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ zeigen. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

#### **AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Der AcAb Test sollte als negativ oder Positiv mit Titer berichtet werden. Gelesen für das spezifische Beflecken des adrenalen kortikalen Zelle Zytoplasmas.

Viele Gewebeanikörper, solcher ANA, AMA, ASMA und EMA können auf diesem Substrat auch beobachtet werden. Die Seren, die diese Reaktionen ausstellen, sollten Negativ für AcAb berichtet werden (Foto 1 für eine AcAb positive Reaktion am Ende dieses Dokumentes sehen).

#### **GRENZEN DES VERFAHRENS**

Unterschiedliche befleckende Muster können beobachtet werden. Die meisten Seren beflecken die vollständige Rinde mit hellgrüner Fluoreszenz der glomerulosa Zone. Einige Seren reagieren nur auf den fasciculate und reticularis Zonen.



## ImmuGlo™ ANTICORPI ANTI-CORTECCIA SURRENALE (AcAb)

REF

Catalogo no. 1171

IMMCO  
DIAGNOSTICS

IVD

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi anti-corteccia surrenale (AcAb) nel siero umano.

### CARATTERISTICHE GENERALI

La malattia del Addison è un disordine dell'endocrino che si presenta in tutti i gruppi d'età. La malattia è caratterizzata di peso perdita, debolezza del muscolo, affaticamento, pressione sanguigna bassa e la pigmentazione della pelle. La maggior parte dei casi della malattia del Addison sono causati tramite la distruzione della corteccia surrenale. Circa 70% dei casi della malattia del Addison sono autoimmuni, mentre la tubercolosi rappresenta 20%. 10% dei casi sono dovute le cause meno comuni quali le infezioni croniche, la amiloidosi, la neoplasia metastatica e la rimozione chirurgica della ghiandola adrenale<sup>1</sup>. Le manifestazioni cliniche importanti della malattia del Addison (anoressia, dolore addominale, sprecare, apatia, debolezza, ipoglicemia di digiuno, capacità diminuita di conservare sodio ed espellere acqua libera, iponatremia, produzione aumentata degli ACTH e lipoproteina  $\beta_2$ ) possono derivare da mancanza di cortisol e di aldosterone<sup>2</sup>.

La diagnosi della malattia del Addison in primo luogo è fatta con i metodi biochimici che rilevano i livelli insufficienti di cortisol seguiti con i metodi che stabiliscono la causa. Questa prova per AcAb è di importanza grande poichè più di 70% dei pazienti con la malattia del Addison hanno il tipo autoimmune. L'immunofluorescenza indiretta (IF) sulla corteccia surrenale del primate o dell'essere umano fornisce un metodo attendibile semplice, preciso e di rilevazione dei autoanticorpi nella malattia del Addison<sup>3-6</sup>. Gli anticorpi della corteccia surrenale (AcAb) sono presenti più notevolmente in di 90% dei pazienti con la malattia del Addison autoimmune di inizio recente. AcAb è inoltre indicatori della malattia del Addison potenziale.

### PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su sezioni del tessuto per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela rivestimento del citoplasma delle cellule corticale adrenale conferma la presenza di AcAb. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).<sup>14</sup>

### CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

#### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

### Materiali forniti

ImmuGlo™ AcAb IFA REF 1171

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

8 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	<b>Vetrini-substrato di corteccia surrenale con 6 pozzetti</b>
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>ADR</b> *	<b>Controllo positivo AcAb</b> , siero umano
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controllo negativo</b> , siero umano
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>Coniugato FITC anti-umana</b> . Tenere lontano dalla luce.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Diluyente per campioni</b>
2 flaconcini	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampone fosfato-salino (PBS)</b> . Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	<b>Mezzo Montante</b> . Non congelare.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Blu di Evans</b>
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	<b>Vetrini coprioggetto</b>

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza  
Micropipetta o pipetta Pasteur  
Pipette sierologiche  
Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)  
Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette  
Acqua distillata o deionizzata  
Contenitore da 1 litro  
Bottiglia di lavaggio  
Carta assorbente  
Incubatore

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali<sup>14</sup>. ATTENZIONE - La sodio azide (NaN<sub>3</sub>) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

## PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

## PROCEDURA

### Metodica d'analisi

#### A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:4 con il Diluente per Campioni fornito (0,1ml di siero + 0,3 ml di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi**. Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto.
9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. NOTA: Un lavaggio scorretto può aumentare la fluorescenza della priorità bassa.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **goccia** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x. I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

## B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:4. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

### Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 6 provette da 1 a 6. Aggiungere 0,3 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:4	1:8	1:16	1:32 etc.

### CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione di almeno 2+ con il controllo positivo AcAb. Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

### RISULTATI

La prova di AcAb dovrebbe essere segnalata come negativo o positivo con il titolo. Colto per la macchiatura specifica del citoplasma delle cellule corticale adrenale.

I vari anticorpi del tessuto, tali ANA, AMA, ASMA ed EMA possono anche essere osservati su questo substrato. I sieri che esibiscono queste reazioni dovrebbero essere segnalati la negazione per gli anticorpi anti-adrenali (vedere la foto 1 per una reazione positiva di AcAb all'estremità di questo documento).

### LIMITI DELLA PROCEDURA

I modelli di macchiatura differenti possono essere osservati. La maggior parte dei sieri macchiano la corteccia intera con la fluorescenza verde intenso della zona di glomerulosa. Alcuni sieri reagiscono soltanto sulle zone di reticularis e fasciculate.



# ImmuGlo™ Anti-Córtex Supra-renal Anticorpo (AcAb)

IVD

IMMCO®  
DIAGNOSTICS

REF

1171

48 Determinations

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti-Córtex Supra-renal (AcAb) no soro humano.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

A doença de Addison é um doença endócrina que ocorra em todos os grupos de idade. A doença é caracterizada pela perda do peso, pela fraqueza do músculo, pela fadiga, pela pressão de sangue baixa e pelo pigmentação da pele. A maioria de casos da doença de Addison são causados pela destruição do córtex supra-renal. Aproximadamente 70% dos casos da doença de Addison são autoimune, quando o tuberculose explicar 20%. 10% dos casos são devido às causas mais menos comuns tais como infecções crônicas, amiloidose, o neoplasia metastáticos, e a remoção cirúrgica da glândula supra-renal <sup>1</sup>. Os manifestações clínicas principais da doença de Addison (anorexia, dor abdominal, desperdiçar, apatia, fraqueza, hipoglicemia digiuno, habilidade diminuída de conservar o sódio e excretar a água livre, o hiponatremia, a produção aumentada dos ACTH, e o lipoproteína β2) podem resultar da falta do cortisol e do aldosterona <sup>2</sup>.

O diagnóstico da doença de Addison é feito primeiramente pelos métodos bioquímicos que detectam os níveis insuficientes do cortisol seguidos pelos métodos que estabelecem a causa. Este teste para AcAb é do significado grande porque mais de 70% dos pacientes com doença de Addison têm o tipo autoimune. O imunofluorescência indireto (SE) no córtex supra-renal do ser humano ou do primata fornece um método simples, preciso, e de confiança de detectar autoanticorpos na doença de Addison <sup>3-6</sup>. Os AcAb estão atuais mais extremamente em de 90% dos pacientes com doença de Addison autoimune do início recente. AcAb é também marcadores da doença de Addison potencial.

## PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em seções do tecido para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado anti-humano fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de AcAb é demonstrada por uma fluorescência verde maçã o citoplasma da pilha cortical supra-renal. A titulação (o recíproca da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições <sup>14</sup>.

## INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

### Armazenamento e preparação

Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.

### Material fornecido

ImmuGlo™ AACAb IFA REF 1171

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 48 determinações cada uma.

8x	<b>SORB SLD 6</b>	Lâminas de substrato AcAb de 6 poços
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL + ADR</b> *	Controlo positivo AcAb, soro humano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Controlo negativo, soro humano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> *	Conjugado ITCF IgG anti-humano. Proteger da luz.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluyente de amostras com BSA
2 vials	<b>BUF WASH</b>	Tampão fosfato alcalino (PBS). Dissolver cada frasco num litro.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	Meio de suporte. Não congelar.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	Contra corante Azul de Evans.
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	Tampas

\* Contem < 0.1% NaN<sub>3</sub>

### Material necessário mas não fornecido

Microscópio de fluorescência  
Micropipeta ou pipeta Pasteur  
Pipetas serológicas  
Prato de coloração (ex: Coplin)  
Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos  
Água destilada ou desionizada  
Contentor de 1 litro  
Garrafa de lavagem  
Toalhetes  
Câmara de incubação

### AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais<sup>14</sup>. AVISO: A azida sódica (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

## RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

## MODO OPERATÓRIO

### Método do teste

#### A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:4 com o Diluente de amostras fornecido (0,1 ml soro + 0,3 ml Diluente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.
2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem. Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.
8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toalhete para retirar o excesso do PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 3 gota de Meio de Suporte uniformemente em tampas e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópis fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

## B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 ao 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:4. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

### Preparação de diluições em série

Numerar 6 tubos de 1 a 6. Juntar 0,3 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 4. Pipetar 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

Tubos	1	2	3	4
Soro	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Transferência		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:4	1:8	1:16	1:32 etc.

### CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode deverse a:

- Turbos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O teste de AcAb deve ser relatado como negativo ou o positivo com titragem. Lido para manchar específico do citoplasma da pilha cortical supra-renal.

Vários outros anticorpos do tecido, tal ANA, AMA, ASMA e EMA podem também ser observados nesta carcaça. Os soros que exibem estas reacções devem ser relatados o negativo para AcAb (ver a foto 1 para uma reacção positiva de AcAb na extremidade deste original).

### LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Os testes padrões manchando diferentes podem ser observados. A maioria de soros mancham o córtex inteiro com fluorescência verde brilhante da zona do glomerulosa. Alguns soros reagem somente nas zonas fasciculata e dos reticularis.

#### REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK. Autoimmune Addison's Disease. Springer semin Immunopathol 1993; 14:275-284.
2. Nerup J. Addison's Disease—clinical studies: a report of 108 cases. Acta Endocrinol 1974; 76:127
3. Betterle C, Volpato M, Rees Smith R et al. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: Markers for low progression to clinical addison's disease. J Clin Endocrinol and Metab; 1997, 82:932-938.
4. Betterle C, Volpato M, Rees Smith R et al. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in children with organ-specific autoimmune diseases: Markers for high progression to clinical addison's disease. J Clin Endocrinol and Metab; 1997, 939-942
5. Laureti S, DeBellis A, Iginò Muccitelli V et al. Levels of adrenocortical autoantibodies correlate with the degree of adrenal dysfunction in subjects with preclinical addison's disease. J Clin Endocrinol and Metab; 1997, 83:3507-3511.
6. Betterle C, Volpato M, Pedini B et al. Adrenal-cortex autoantibodies and steroid-producing cells autoantibodies in patients with addison's disease: comparison of immunofluorescence and immunoprecipitation assays. J Clin Endocrinol and Metab; 1999, 84:618-622.
7. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. [HHS Pub. No. (CDC) 1999, 93-8395].

**Photo 1. Adrenal cortex positive for anti-adrenal antibodies.**

*For technical assistance please contact:*



**IMMCO Diagnostics, Inc.**  
**60 Pineview Drive**  
**Buffalo, NY 14228-2120**  
**Telephone: (716) 691-0091**  
**Fax: (716) 691-0466**  
**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**  
**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

**IMMCO**  
**DIAGNOSTICS**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé  
EMERGO Group, Inc.  
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands  
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)

REV.MAY2009

Document No. PI4171CE