



SISTEMAS DE ANÁLISIS DE ANA POR INMUNOFLUORESCENCIA

Para uso diagnóstico in vitro
Para El Uso Profesional

USO PREVISTO: Se trata de una determinación indirecta por inmunofluorescencia para la detección semicuantitativa de anticuerpos antinucleares (ANA) en suero humano. Este sistema de análisis ha de emplearse como ayuda en la detección de anticuerpos asociados a las enfermedades reumáticas sistémicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Anticuerpo antinuclear (ANA) es un término general que se emplea para referirse a los autoanticuerpos dirigidos contra diversas proteínas del núcleo celular. En los primeros estudios sobre estos autoanticuerpos, realizados con técnicas de inmunofluorescencia, se observaron determinados detalles de unas pocas proteínas del núcleo (1). A la vista de la elevada correlación entre la presencia de ANA y el lupus eritematoso sistémico (LES), basta con que no estén presentes para descartar la enfermedad (2).

Aunque los anticuerpos específicos del ADN siguen mostrando una elevada correlación con el LES (3), también se han detectado algunas macromoléculas nucleares (4) y citoplásmicas (5-7) asociadas a otras enfermedades del tejido conjuntivo (8-10). Parece que algunos de estos autoanticuerpos tienen un significado diagnóstico y/o pronóstico en la esclerosis sistémica progresiva (11-12), las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (13-15), el síndrome de Sjögren (16-17), la polimiositis (18) y/o la artritis reumatoide (19). Debido a estas asociaciones a enfermedades, en la actualidad se considera que la detección de ANA constituye una herramienta general para la detección selectiva de las enfermedades del tejido conjuntivo (20).

La sensibilidad de la prueba varía con el tipo de sustrato utilizado, el procedimiento de fijación y los tipos de ANA presentes en los sueros. Por lo general, los sustratos de cultivos celulares muestran mayor sensibilidad que los cortes de tejido (21-24).

El sistema de análisis de ANA de Immuno Concepts con células epiteloides humanas (HEp-2) mitóticas* representa un avanzado sistema de inmunofluorescencia para la detección de ANA. Se ha demostrado que las células HEp-2 con figuras mitóticas son más sensibles y proporcionan un modelo de reconocimiento más preciso que el clásico sustrato de riñón de ratón, para detectar anticuerpos en la esclerosis sistémica progresiva (ESP) (25). Las figuras mitóticas mejoran el reconocimiento diferencial del modelo y ayudan a detectar antígenos nucleares no notificados anteriormente, que alcanzan concentraciones superiores en las células que se encuentran en mitosis (26-28).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El sistema de análisis de ANA por inmunofluorescencia de Immuno Concepts emplea la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes descrita por primera vez por Weller y Coons (29). Las muestras de pacientes se incuban con un sustrato antigénico que permite la unión específica de los autoanticuerpos a los núcleos de las células. Si hay ANA, se forma un complejo antígeno-anticuerpo estable. Tras el lavado para retirar los anticuerpos unidos de forma inespecífica, se

**Mitosis es un término que se emplea para describir el proceso de división de las células. En general, se divide en seis fases, a saber, interfase, profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.*

incuba el sustrato con anticuerpos antihumanos conjugados con fluoresceína. Si los resultados son positivos, se forma un complejo estable con tres partes: el anticuerpo fluorescente unido al anticuerpo antinuclear humano, unido a su vez al antígeno nuclear. Este complejo se puede visualizar con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. En las muestras positivas, los núcleos celulares mostrarán una fluorescencia de color verde manzana, con un patrón de tinción característico de la particular distribución del antígeno nuclear en las células. Si no hay ANA en las muestras, el núcleo no presentará un patrón de fluorescencia nuclear claramente discernible.

COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

Utilización: Todos los componentes se entregan listos para su empleo, sin necesidad de fragmentarlos ni prepararlos (excepto el tampón PBS, que debe ser disuelto en agua desionizada o destilada antes de utilizarlo).

Conservación: Todos los componentes se pueden conservar en refrigerador a 2 y 10°C. Una vez preparado, el tampón PBS debe conservarse en envases con tapón de rosca y se conserva entre 2 y 25°C.

Estabilidad: Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Portaobjetos de sustrato [SLIDE]: Portaobjetos con sustrato para ANA con células HEp-2 (con figuras mitóticas) cultivadas y estabilizadas directamente en los pocillos del análisis. El exclusivo diseño de los fosos del portaobjetos reduce al mínimo la contaminación cruzada de los pocillos durante la prueba. La bolsa que contiene el portaobjetos se rellena con un gas inerte no tóxico que contribuye a la estabilidad de las células.

Control positivo homogéneo [CONTROL|+]: N° de catálogo 2021. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra el ADN y/o los antígenos nucleares DNP. Este suero da una reacción de tinción homogénea con el sustrato de células HEp-2 de Immuno Concepts. La región cromosómica de las células mitóticas muestra la misma reacción de tinción homogénea.

Control positivo moteado [CONTROL|+]: N° de catálogo 2022. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra el Sm y/o los antígenos nucleares RNP. Este suero da una de las reacciones de tinción moteada más habituales que se observan con el sustrato de células HEp-2 de Immuno Concepts. La región cromosómica de las células mitóticas muestra una reacción de tinción negativa.

Control positivo nucleolar [CONTROL|+]: N° de catálogo 2023. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra los antígenos del nucléolo. Este suero da una reacción de tinción nucleolar con el sustrato de células HEp-2 de Immuno Concepts.

Control positivo del centromere [CONTROL|+]: N° de catálogo 2025. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano positivo con anticuerpo específico contra los centrómeros cromosómicos (cinetocoro). Este suero da una discreta reacción de tinción moteada con el sustrato de células HEp-2 de Immuno Concepts. La región cromosómica de las células mitóticas muestra la misma reacción discreta de tinción moteada.

Suero de control titulable [TC]: N° de catálogo 2026. Vial listo para usar, que contiene 0,5 ml de suero de control humano positivo que será tratado como si fuera una muestra de paciente sin diluir. Consulte el valor de la titulación en la etiqueta del vial.

Suero de control negativo [CONTROL|-]: N° de catálogo 2031. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 1,0 ml de suero de control humano negativo. Aunque el suero de control negativo puede dar cierta fluorescencia del citoplasma al teñirse de forma más brillante la región no cromosómica de la célula mitótica, no presenta un patrón de tinción nuclear discernible.

Reactivo con anticuerpos fluorescentes [CONJFITC]: N° de catálogo 2009 (9,0 ml), 2075 (23 ml), 2009CS (9,0 ml), 2075CS (23 ml). IgG antihumana conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC). El reactivo se presenta listo para usar en frascos con cuentagotas de precisión, con 9,0 ml por cada 10 portaobjetos, en kits de análisis completos.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Polvo tampón PBS [PWDR|PBS]: N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Los kits de análisis completos llevan una bolsa de polvo tampón por cada cinco portaobjetos).

Preparación: Disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada, tápelo el recipiente y almacenar entre 2 y 25° C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otros cambios visibles.

Medio para preparaciones microscópicas semipermanentes **SOLNIMM:** N° de catálogo 1111. Vial con cuentagotas listo para usar, que contiene 5,0 ml de medio para preparaciones microscópicas a base de glicerol.

Cubreobjetos **CVSLP:** N° de catálogo 1042. Cada envase contiene diez cubreobjetos de vidrio n° 1 de 24 x 64 mm.

OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas para dispensar volúmenes de 20-25 µl
Jarras Coplin o platillos de tinción
Frasco para exprimir o pipetas de Pasteur
Pipetas serológicas
Envases de un litro (para el tampón PBS)
Agua desionizada o destilada
Probetas para preparar las diluciones de suero
Papel secante o toallas de papel
Cámara de incubación
Guantes desechables
Cronómetro
Microscopio de fluorescencia equipado con un filtro excitador de 495 nm y un filtro de barrera de 515 nm

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos homologados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los materiales del kit deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de pacientes deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o con las conducciones de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. Si fuera necesario utilizar sueros hemolizados o lipémicos, caliéntelos para inactivarlos a 56°C durante 30 minutos para obtener resultados óptimos. No utilice sueros con contaminación microbiana.
7. El suero de control titulable debe utilizarse para controlar la reproducibilidad entre lotes y entre ciclos. No está concebido para medir la sensibilidad o la especificidad generales del ensayo.
8. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
9. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
10. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
11. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
12. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
13. Todos los reactivos, portaobjetos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
14. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
15. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.

16. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención: La muestra ideal es el suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

Sustancias que interfieren: No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados aberrantes. Si la muestra presenta partículas visibles, deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

Conservación: Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o menos. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

PRECAUCIÓN: Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONTROL DE CALIDAD

Los controles positivos, negativos y PBS deben probarse una vez por proceso. El control positivo debe dar una fluorescencia de color verde manzana en los núcleos de las células, con un patrón claramente discernible característico del suero de control utilizado. El control negativo debe dar una fluorescencia inespecífica de color verde mate en el citoplasma y en el núcleo, pero sin un patrón discernible de tinción nuclear. El control PBS se emplea para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos, y no debe dar fluorescencia verde. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

CONTROL TITULABLE OPCIONAL

Para interpretar los títulos, muchos laboratorios empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "hacia atrás" hasta la dilución 1:40. El primer pocillo en el que se aprecie un patrón discernible de tinción nuclear corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos.

El título medio y el rango de títulos (\pm una dilución a cada lado de la media) determinados para este número de lote, han sido establecidos en nuestro laboratorio y se consideran la norma. Este control se facilita para que cada laboratorio pueda evaluar la reproducibilidad (precisión) de sus análisis de ANA. Como quiera que este control no ha sido diseñado como indicador de la exactitud de la titulación, cada laboratorio deberá establecer su propio criterio de valoración del título medio para cada muestra, utilizando esta información para evaluar la reproducibilidad (precisión) de unos ciclos a otros.

Mediante la reiterada evaluación de este control titulable utilizando el sistema de análisis de ANA por inmunofluorescencia de Immuno Concepts, se ha establecido un título medio para cada número de lote. El número de lote, el título medio y el rango de títulos (\pm una dilución doble a cada lado de la media) figuran en la etiqueta del vial y deben servir como guía para el funcionamiento del sistema de análisis.

Es importante no confundir la intensidad de la fluorescencia con la presencia o ausencia de anticuerpos antinucleares. La clave para determinar si una dilución de suero es positiva radica en la aparición de un patrón claramente discernible, sea cual sea la intensidad de la tinción fluorescente.

Este control titulable mostrará el típico patrón moteado que se asocia al anticuerpo RNP. También puede aparecer un segundo patrón de NSp I (varias manchas aisladas en el núcleo de las células que se encuentran en la interfase); pero el patrón que se empleará como criterio de valoración será el típico moteado correspondiente a RNP.

Puede que los valores obtenidos en nuestro laboratorio difieran de los suyos. He aquí algunos de los muchos factores que pueden afectar a sus resultados:

1. El tipo de luz utilizada. Las fuentes de luz de mercurio producen una energía de excitación a 495 nm mayor que las de cuarzo/halógenas. Las fuentes de luz de mercurio de 50, 100 y 200 vatios difieren poco en la energía de excitación a 495 nm. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas de 100 vatios producen una energía de excitación a 495 nm superior a la proporcionada por las de cuarzo/halógenas de 50 vatios.
2. El estado de la fuente de luz y su edad. Esto es especialmente cierto para las fuentes de luz de mercurio, que suelen experimentar una reducción gradual de la energía de excitación a 495 nm antes de agotarse. Esta gradual reducción de la energía de excitación puede producir una pérdida significativa de la sensibilidad en un plazo de semanas. El problema se puede evitar con un registro cronológico. Para que los resultados sean óptimos, cambie las bombillas de mercurio de 500 vatios cada 100 horas, y las de 100 ó 200 vatios cada 200 horas. Por lo general, las fuentes de luz de cuarzo/halógenas no experimentan una reducción gradual de la energía de excitación antes de agotarse.
3. El tipo de filtro excitador utilizado. Los filtros excitadores por interferencia proporcionan mayor sensibilidad en una longitud de onda mucho menor que los filtros excitadores por absorción. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
4. Correcta alineación del haz de luz del microscopio. Consulte las instrucciones del manual del microscopio de fluorescencia.
5. La apertura numérica del objetivo. Si se emplea fluorescencia por luz incidente (EPI), la fluorescencia aumenta exponencialmente con la apertura numérica (NA) del objetivo. Así, puede que un objetivo de 40X con una NA de 0,65 interprete una o más diluciones como inferiores a las determinadas con un objetivo de 40X con una NA de 0,85. La apertura numérica va impresa a un lado del objetivo.
6. Filtros de supresión. Los filtros de supresión reducen longitudes de onda de excitación concretas, y se pueden utilizar para reducir la sensibilidad. Si desea más información, consulte el manual de su microscopio de fluorescencia, o con su delegado de ventas.
7. Precisión y exactitud de la técnica de dilución, del equipo y de la realización de los procedimientos de análisis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

Se recomienda un aumento total de 200X para la detección selectiva de positivos y negativos, y de 400X para el reconocimiento de patrones y la visualización de células mitóticas.

Negativos: Se considera que un suero es negativo para la presencia de anticuerpos antinucleares si la tinción es igual o inferior a la del pocillo de control negativo, sin patrón claramente discernible. Puede que el citoplasma muestre una tinción débil, más brillante en la región no cromosómica de las células mitóticas, pero sin patrón nuclear claramente discernible.

Positivos: Se considera que un suero es positivo si el núcleo muestra un patrón de tinción claramente discernible en una mayoría de las células que se encuentran en la interfase.

Títulos: Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "hacia atrás" hasta la dilución 1:40. El primer pocillo en el que se aprecia un patrón discernible corresponde al título que se considera como criterio de valoración. Recomendamos utilizar esta técnica para determinar los criterios de valoración de los títulos. Es importante no confundir la intensidad de la tinción con la presencia o ausencia de anticuerpos antinucleares. La clave para determinar si una determinada dilución de suero es positiva radica en la aparición de un patrón claramente discernible, sea cual sea la intensidad de la tinción.

PRECAUCIÓN: Algunos sueros pueden presentar tinción en núcleos y citoplasmas sin patrón nuclear evidente. Este fenómeno suele deberse a los anticuerpos heterófilos, y se considerará resultado negativo (30).

INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA

Es posible semicuantificar la intensidad de la fluorescencia con arreglo a las directrices sobre reactivos con anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC).

- 4+ Verde manzana brillante (fluorescencia máxima): perfil celular claramente definido; centro celular claramente definido.
- 3+ Fluorescencia de color verde manzana menos brillante: perfil celular claramente definido; centro celular claramente definido.
- 2+ Patrón celular definido, pero fluorescencia tenue: perfil celular menos definido.
- 1+ Fluorescencia muy leve: perfil celular prácticamente indistinguible del centro celular en la mayor parte de los casos.

Immuno Concepts, N.A. Ltd. facilita un portaobjetos estándar para la determinación de la intensidad de la fluorescencia, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900.

NOTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Selección: Los resultados deben ser notificados como muy positivos o positivos en la dilución 1:40; y hay que informar del patrón de tinción del núcleo.

Titulación: El resultado que se notifica es el de la última dilución en la que se observa una tinción claramente discernible. Los resultados con una fuerte reacción a la dilución más alta deben ser reportados como mayores que esa dilución. Los títulos de 1:40 a 1:80 se consideran bajos; de 1:160 a 1:320, se consideran medios; y de 1:640 en adelante, se consideran elevados. No es necesario determinar el punto final del título. Cualquier título de ANA mayor o igual a 1:640 se considera un título alto y alertará al clínico para que realice pruebas adicionales. Cada laboratorio debe establecer su propio esquema de titulación, basado en los anticuerpos que se detectan en la población de pacientes.

DETECCIÓN DEL PATRÓN

Homogéneo: Tinción sólida del núcleo, con o sin enmascaramiento evidente de los nucléolos. La región cromosómica de las células mitóticas en metafase es claramente positiva, con una intensidad de la tinción suave o periférica superior o igual a la de los núcleos en interfase.

Sinónimos: Difuso; sólido.

Antígenos nucleares: ADNbc; ADNn; DNP; histona.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados sugieren LES. Los títulos bajos sugieren LES u otras enfermedades del tejido conjuntivo (31).

Periférico: Tinción sólida, sobre todo alrededor de la región externa del núcleo, con tinción más débil del centro de éste. La región cromosómica de las células mitóticas en metafase es claramente positiva, con una intensidad de la tinción suave o periférica superior o igual a la de los núcleos en interfase.

Sinónimos: Borde, áspero, membranoso.

Antígenos nucleares: ADNbc, ADNmc, ADNn, DNP, histona.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados sugieren LES; los títulos bajos sugieren LES u otras enfermedades del tejido conjuntivo (31).

Moteado: Tinción granular áspera o fina del núcleo, generalmente sin tinción fluorescente de los nucléolos. La región no cromosómica de las células mitóticas en metafase se tiñe, mientras que la región cromosómica no lo hace.

Antígenos nucleares: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La; y otros sistemas de antígenos/anticuerpos aún no caracterizados.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados sugieren LES (antígeno Sm), enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (antígeno RNP), esclerodermia (antígeno Scl-70) o síndrome de Sjögren-complejo seco (antígeno SSA/Ro o SSB/La). Los títulos bajos sugieren otras enfermedades del tejido conjuntivo (32).

Nucleolar: Tinción moteada grosera de grandes dimensiones, generalmente menos de 6 manchas por célula, con o sin manchas finas ocasionales, entre 5 y 10. La región no cromosómica de las células mitóticas en metafase se tiñe mucho, mientras que la región cromosómica lo hace débilmente. Las células en anafase y en telofase pueden teñirse de forma similar a como lo hacen los núcleos en interfase.

Antígenos nucleares: Se suelen denominar ARN 4-6s, y otros antígenos nucleares como fibrilarina, polimerasa I de ARN, NOR 90 y PM/Scl.

Asociación a enfermedades: Los títulos elevados prevalecen en la esclerodermia y el síndrome de Sjögren (33).

Centrómero: Un patrón de tinción discretamente moteado es muy sugerente de la variante de la esclerosis sistémica progresiva que se conoce como síndrome CREST[§] (25). Las manchas nucleares son muy discretas y su número suele ser múltiplo de 46 (habitualmente 23-46 manchas por núcleo). Dado que los centrómeros son constricciones en las que la fibras fusiformes se unen a los cromosomas, las células mitóticas mostrarán la misma reacción de moteado en la región cromosómica (12).

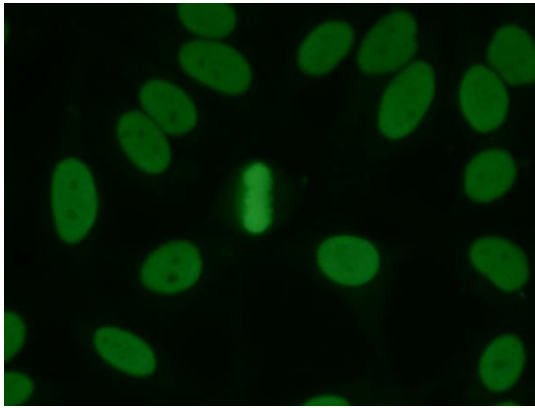
Sinónimos: ACA; moteado discreto.

Antígenos nucleares: Centrómero cromosómico (cinetocoro).

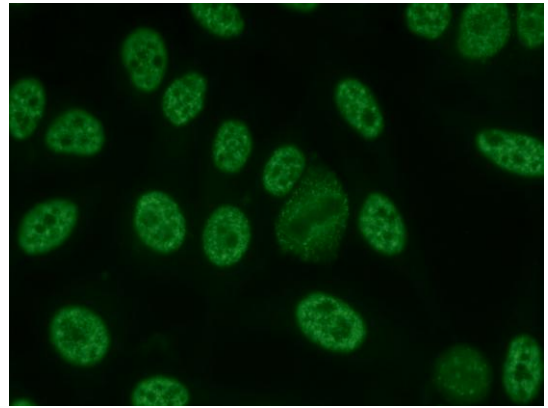
Asociación a enfermedades: Muy sugerentes de la variante de la esclerosis sistémica progresiva que se conoce como síndrome CREST (25)

PATRONES BÁSICOS DE TINCIÓN

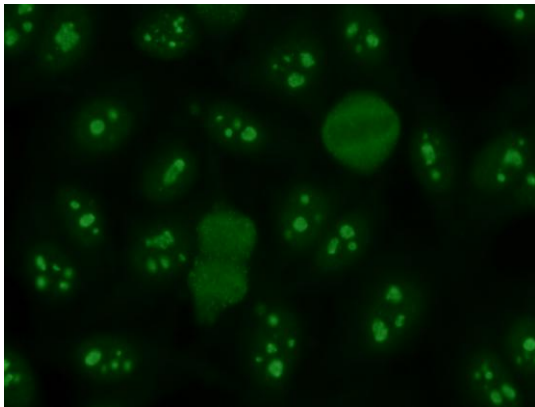
[§]CREST es una forma de ESP con calcinosis importante, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia y telangiectasias.



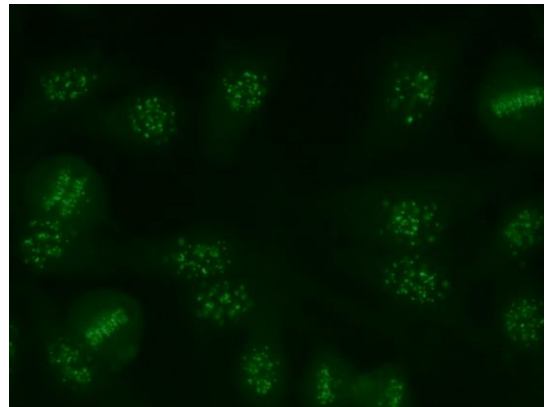
Homogénea



Moteado



Nucleolar



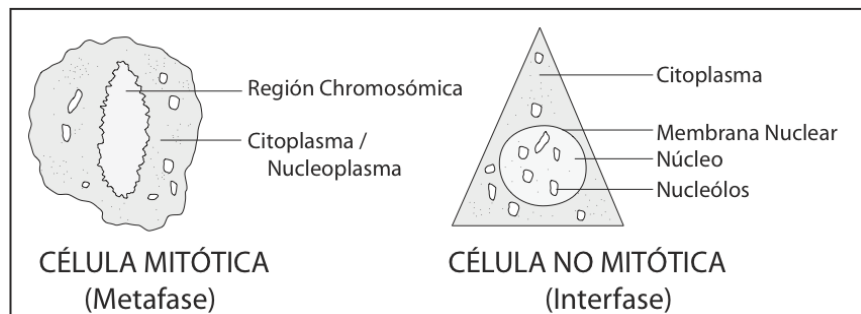
Centrómero

CÉLULAS MITÓTICAS

DETECCIÓN

Las células mitóticas deben ser visibles en todos los campos con una ampliación de 200X o inferior. Para comprobar si una célula se encuentra en mitosis debe utilizarse la ampliación de 400X. Las células mitóticas muestran una forma redondeada característica, sin membrana nuclear detectable. Por lo general, la región cromosómica de las células mitóticas muestra una forma irregular en el seno de la célula debido a la ausencia de membrana nuclear, y una extrema constricción de los cromosomas.

Los sueros positivos para ADN y/o DNP y/o histona (como el control positivo homogéneo de Immuno Concepts) presentarán una tinción brillante de la región cromosómica de estas células. En las muestras negativas para ADN y/o DNP y/o histona (como el control positivo homogéneo de Immuno Concepts), los cromosomas de las células mitóticas no se teñirán y será difícil verlos.



USO DE CÉLULAS MITÓTICAS

Distinción entre anticuerpos moteados y homogéneos: En ocasiones es difícil distinguir un patrón de tinción moteado fino de otro homogéneo. Si el patrón es homogéneo, habrá una tinción sólida de los cromosomas de las células mitóticas. Si el patrón es estrictamente moteado, la región situada fuera de los cromosomas presentará una reacción de moteado fino.

NOTA: Si se presenta un moteado fino de toda la célula mitótica junto con la tinción sólida de la región cromosómica, es muy probable que haya dos o más anticuerpos. Designe la dilución de selección como moteada/homogénea, y titule cada anticuerpo hasta el criterio de valoración.

Anticuerpo periférico frente a anticuerpo contra la membrana nuclear: En general, los anticuerpos que muestran un patrón periférico se asocian a antígenos nucleares de ADN/DNP. Los títulos elevados de estos anticuerpos sugieren LES. En sustratos que no incluyen células mitóticas puede ser difícil distinguir el patrón periférico del de los anticuerpos contra la membrana nuclear. Con las células mitóticas de Immuno Concepts es posible distinguir estos patrones, pues la región cromosómica de las células mitóticas se teñirá intensamente con un patrón periférico, pero no será teñida por el anticuerpo contra la membrana nuclear. Esta distinción es importante desde el punto de vista clínico, pues los anticuerpos contra la membrana nuclear carecen de especificidad ADN/DNP y no se asocian al LES (34).

Anticuerpo anticentrómero (ACA) frente a centrómero atípico con aspecto de anticuerpo moteado: Para verificar la presencia de ACA, la región cromosómica de las células mitóticas debe teñirse brillantemente con manchas discretas. Si la región cromosómica no se tiñe, es que el anticuerpo carece de especificidad por el cinetocoro y no se asocia a la variante CREST de la esclerodermia (35). Si la región cromosómica no se tiñe, el anticuerpo no es ACA y debe designarse como "moteado atípico".

FLUORESCENCIA CITOPLÁSMICA

Aunque los anticuerpos contra antígenos citoplásmicos no suelen asociarse a enfermedades del tejido conjuntivo, se pueden detectar con sustratos de cultivos de células epiteliales (36). Los anticuerpos que se detectan con más frecuencia son los dirigidos contra las mitocondrias y el músculo liso; suelen asociarse a la mononucleosis, la hepatitis activa crónica y las hepatopatías (37-38). Con el sustrato de células HEp-2 también se han demostrado anticuerpos contra el músculo liso en pacientes con verrugas (39).

Anticuerpos anti-mitocondriales (AMA): Manchas discretas, concentradas en la región perinuclear de la célula y que se extienden, con menor intensidad, a las regiones exteriores del citoplasma. Hay que distinguirlo de los anticuerpos anti-Golgi, que suelen teñir sólo un lado de la región perinuclear, y de los anticuerpos anti-ribosomas, que muestran manchas más finas con aspecto filamentosos compatible con la localización del retículo endoplásmico en el interior de la célula.

NOTA: La forma más fácil de distinguir las manchas perinucleares de la tinción periférica del núcleo consiste en observar que las manchas mitocondriales forman una tinción moteada discontinua en torno al exterior de la membrana nuclear, mientras que en los sueros periféricos se forma una tinción lisa sólida en el interior de la membrana nuclear.

DESIGNE LOS SUEROS COMO NEGATIVOS PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES, Y VERIFIQUE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTIMITOCONDRIALES EN EL SUSTRATO ESPECÍFICO CORRESPONDIENTE.

Anticuerpos anti-músculo liso (ASMA): Tinción fibrosa muy fina en todo el citoplasma, con aspecto de tela de araña. Al contrario que los anticuerpos antimitocondriales, la tinción de los anticuerpos anti-músculo liso es uniforme en todo el citoplasma, y puede llegar al núcleo. Por lo general, las células mitóticas muestran grandes manchas discretas en el exterior de la región cromosómica. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-músculo liso son muy específicos de la actina (40-41).

DESIGNE LOS SUEROS COMO NEGATIVOS PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES, Y VERIFIQUE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-MÚSCULO LISO EN EL SUSTRATO ESPECÍFICO CORRESPONDIENTE.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos antinucleares. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.

2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos antinucleares. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Determinados fármacos, como procainamida e hidralazina, pueden inducir un trastorno similar al lupus eritematoso (42). Los pacientes con LE inducido por fármacos pueden dar positivo para los ANA homogéneos u homogéneos/periféricos que suelen ir dirigidos contra las histonas nucleares (43).
4. Un pequeño porcentaje de pacientes con LES puede no presentar ANA en el análisis por inmunofluorescencia indirecta, pero sí empleando otras técnicas (44).
5. No es necesario determinar el punto final del título. Cualquier título de ANA mayor o igual a 1:640 se considera un título alto y alertará al clínico para que realice pruebas adicionales. Cada laboratorio debe establecer su propio esquema de titulación, basado en los anticuerpos que se detectan en la población de pacientes. Aunque una titulación elevada de ANA puede ser muy sugerente de enfermedad del tejido conjuntivo, no debe considerarse diagnóstica, sino parte de la historia clínica general de un paciente.
6. A menudo, los patrones de tinción cambian con la progresiva titulación de los sueros. Este fenómeno suele deberse a la presencia de más de un anticuerpo antinuclear.
7. Como quiera que existen muchas opciones en los microscopios de fluorescencia, se recomienda estandarizar las fuentes de luz, los filtros y los medios ópticos para comparar los títulos de los pacientes obtenidos en diferentes laboratorios.
8. También se observan ANA en un pequeño porcentaje de pacientes con enfermedades infecciosas y/o neoplásicas (9).

VALORES ESPERADOS

En un gran centro médico universitario se obtuvieron los siguientes datos en un período de 2 años, utilizando el sustrato de células HEP-2 para ANA (45). Tabla 1.

TABLA 1

Diagnóstico	Tipos de patrón	% Positivo
Población anómala (más de 4.500 sueros evaluados):		
Lupus eritematoso sistémico	S, P+H, H, P	93
Artritis reumatoide	S, H	40
Enfermedad mixta del tejido conjuntivo	S	99
Esclerosis sistémica progresiva-difusa	S, N	85
Esclerosis sistémica progresiva-CREST	ACA	93
Artritis reumatoide juvenil		
Sistémica	S	14
Poliarticular	S	13
Pauciarticular-B27+	-	0
DM/PM	S	25
Vasculitis	S	20
Población normal (más de 9.000 sueros evaluados):		
20-60 años	S	2
70-80 años	S	3,5

Abreviaturas: S=Moteado, H=Homogéneo, P=Periférico, N=Nucleolar, ACA=anti-Centrómero

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se ha comparado el sistema de análisis de ANA de Immuno Concepts con otros dos sistemas de detección de anticuerpos fluorescentes comercializados (45). En el estudio se utilizaron 97 muestras de suero de individuos normales y de otros diagnosticados de lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), esclerosis sistémica progresiva de Raynaud-variante CREST (ESP-CREST), artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil (ARJ) y otras enfermedades del tejido conjuntivo. Los sueros fueron evaluados a las diluciones de selección recomendadas por cada fabricante. En la tabla 2 se resumen los resultados del estudio.

TABLA 2

DIAGNÓSTICO	Número de pacientes	Immuno Concepts Positivos 1:40	KB Cell Positivos 1:20	Riñón de ratón Positivos 1:20
LES	23	23	22	21
EMTC/superposición	7	7	6	4
ESP de Raynaud-CREST	17	17	16	7
AR	2	2	2	0
ARJ	4	4	4	3
Otras enfermedades del tejido conjuntivo	9	9	9	6
Controles hospitalizados	11	7	3	2
Controles normales	24	1	1	0

Los pacientes del grupo de "otras enfermedades del tejido conjuntivo" con el sustrato de Immuno Concepts, presentaban artritis temporal (1), enfermedad del tejido conjuntivo no diferenciada (1), polimiositis (2), monoartritis (2), poliartritis (3), y no fue posible clasificarlos mejor.









Los controles hospitalizados con ANA positivos con el sustrato de Immuno Concepts presentaban diabetes (2), artritis no clasificable (3), hipotiroidismo (1) y enfermedad renal por inmunocomplejos (1) que no cumplía los criterios para el diagnóstico de LES.

BIBLIOGRAFICI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: *The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D.* Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:785-790, 1980.
22. McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. *J. Rheum.* 7:339-347, 1980.
23. Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
24. Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am. J. Clin. Pathol.* 58:388-393, 1972.
25. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
26. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immunol.* 121:2228-2234, 1978.
27. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. *Arthritis Rheum.* 24:S109, 1981.
28. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzler, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
29. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
30. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
31. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
32. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
33. von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Semin. in Arthritis and Rheum.* 24:323-358, 1995.
34. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. *Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20.* American Society of Clinical Pathologists, 1980.
35. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
36. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.

37. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). Clin. Exp. Immunol. 39:328-336, 1980.
38. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
39. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
40. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
41. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 24:266-272, 1976.
42. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
43. Fritzier, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
44. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
45. Data on file at Immuno Concepts.

En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.

	Fabricante		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Limitación De la Temperatura		Contiene suficiente para <n> pruebas
	Consulte las instrucciones de uso		Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro
	MDSS GmbH Schiffgraben 41 D-30175 Hannover, Germany		

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ANA POR INMUNOFLUORESCENCIA

NOTA: Si el laboratorio esta usando un sistema procesador de muestras, el proceso y las recomendaciones del fabricante del sistema procesador deberian ser seguidas. El sistema procesador de slides deberia ser programado para las diluciones apropiadas de las muestras, los volúmenes a dispensar y los tiempos de incubación según se detalla abajo.

- 1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN (PBS)**

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada. El tampón PBS se puede tapar y conservar a 2-25°C durante cuatro semanas como máximo.
- 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES**

Selección: Disuelva las muestras de pacientes a 1:40 añadiendo 0,05 ml (50 µl) de suero a 1,95 ml de PBS reconstituido.
Titulación semicuantitativa: Prepare series de diluciones de la muestra o muestras de selección (p. ej. 1:80, 1:160, 1:320...etc.) utilizando PBS.
- 3. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON SUSTRATO (20-25 µl/pocillo)**

Saque los portaobjetos de las bolsas y disponga los sueros de control en los pocillos de control, como se indica: Invierta el frasco cuentagotas de control y apriete hasta que se vea una gota en la punta. Toque suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos. Añada una gota (20-25 µl) de muestra de paciente a los pocillos numerados.
NOTA: Para la selección general se recomienda el control positivo homogéneo. Para la titulación semicuantitativa elija el control positivo cuyo patrón de fluorescencia sea más parecido al de la muestra de selección (p. ej., para una muestra de paciente que presente un patrón de fluorescencia moteado en la selección, utilice un control positivo moteado).
PRECAUCIÓN: SI LA PUNTA DEL CUENTAGOTAS TOCA DIRECTAMENTE LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS, SE PUEDE DAÑAR EL SUSTRATO DE ANTÍGENO.
- 4. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**

Ponga los portaobjetos en una cámara cubierta y húmeda (basta con una placa de Petri con una toalla de papel humedecida). Incube con la tapa puesta durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 5. ENJUAGUE CON PBS**

Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos un poco con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
NOTA: Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos, dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero a la fila superior de pocillos y luego la superior.
- 6. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar 10-30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.
- 7. REACTIVO FLUORESCENTE PARA DETECTAR ANTICUERPOS (cubra los pocillos con 12-14 gotas)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante. Vuelva a colocar de inmediato el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos por completo con el reactivo fluorescente para detectar anticuerpos; empiece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos. El reactivo fluorescente para detectar anticuerpos ha sido titulado para compensar el agua desionizada o destilada residual que queda en el portaobjetos tras el enjuague.
NOTA: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento, pues se podría dañar el sustrato.
NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO.
- 8. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**

Ponga la tapa de la cámara de incubación y cúbrala con una toalla de papel para impedir la exposición a la luz, si la cámara no es opaca. Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 9. ENJUAGUE CON PBS**

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos un poco con PBS. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 10. LAVADO CON PBS (10 minutos)**

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplin. Este lavado puede durar 10-30 minutos sin que varíen los resultados finales, cuando no se utiliza contratinción.
Contratinción opcional: Añada 5-10 gotas de contratinción (azul de Evan al 0,5%) por 100 ml de PBS antes de sumergir el portaobjetos. Dado que el grado de contratinción deseado puede variar de unos individuos a otros, se puede aumentar o reducir la intensidad de la contratinción simplemente ajustando el número de gotas que se añaden al PBS en este lavado.
- 11. PREPARACIÓN DE LOS CUBREOBJETOS**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos 3-5 veces en agua desionizada o destilada (Opcional). Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN PONER EL CUBREOBJETOS. Añada 4-5 gotas de medio de preparación semipermanente en la línea media de cada portaobjetos. Coloque el cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen bolsas de aire, haciendo bajar suavemente el cubreobjetos de un lado del portaobjetos al otro.
NOTA: Si pone demasiado medio de preparación puede que la fluorescencia de fondo sea elevada debido a la diseminación de la luz, o que la resolución de las células no sea clara (imagen borrosa). Si ha puesto demasiado medio de preparación, puede retirarlo del portaobjetos secando suavemente el cubreobjetos con papel secante o para lentes, evitando cualquier movimiento directo del cubreobjetos.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

