



SISTEMA DE ANÁLISIS DE ANA-Ro POR INMUNOFLUORESCENCIA HEp-2000[®]

**Para uso diagnóstico in vitro
Para El Uso Profesional**

USO PREVISTO: Esta es una prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos para la detección semicuantitativa del anticuerpo antinuclear (ANA, por sus siglas en inglés) IgG en suero humano por microscopía fluorescente manual o mediante el microscopio de fluorescencia semiautomatizado Image Navigator[®]. En este sistema de análisis se emplean células HEp-2 transfectadas[†], lo que permite identificar los autoanticuerpos contra el antígeno SSA/Ro. Los autoanticuerpos contra SSA/Ro pueden mostrar un patrón de tinción distintivo en las células transfectadas. Si se observa este patrón, el mismo se considera como prueba confirmadora de la presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro.

La ausencia de este patrón distintivo no descarta la posible presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro.

Este sistema de pruebas está diseñado para su uso en la detección de anticuerpos asociados con la enfermedad reumática sistémica junto con otros resultados de laboratorio y clínicos. Un operador capacitado debe confirmar los resultados que se generen en el dispositivo semiautomatizado Image Navigator[®] y en software.

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 sustratos 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). La detección de autoanticuerpos contra el antígeno SSA/Ro es especialmente variable. Los tejidos de roedores no contienen niveles detectables del antígeno SSA/Ro (25), y la sensibilidad de detección de anticuerpos contra el SSA/Ro en sustratos de cultivos celulares varía, según los informes, del 50 al 90% (26-27).

[†]Las células transfectadas y su aplicación están protegidas por la patente estadounidense 5,518,881

El sistema de análisis de ANA HEp-2000® de Immuno Concepts con células epitelioides 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) (28). 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 (29-31). Las células HEp-2 de este sistema de análisis han sido transfectadas con varias copias de la secuencia de ADN específica que transporta la información del autoantígeno SSA/Ro. Aproximadamente el 10-20% de las células transfectadas expresan este antígeno en exceso, por lo que la detección de autoanticuerpos contra el SSA/Ro es más homogénea que en células HEp-2 no transfectadas. Los autoanticuerpos contra SSA/Ro pueden mostrar un patrón de tinción distintivo en las células transfectadas. Si se observa este patrón, el mismo se considera como prueba confirmadora de la presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro.

La ausencia de este patrón distintivo no descarta la posible presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El sistema de análisis de ANA por inmunofluorescencia de IC emplea la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes descrita por primera vez por Weller y Coons (32). 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 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 entre 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 permanecen estables, tanto en el kit cerrado y después de abierto, durante al menos 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice ninguno de los componentes tras la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Portaobjetos de sustrato **SLIDE:** Portaobjetos con sustrato para ANA con células HEp-2000® (con figuras mitóticas) cultivadas y estabilizadas directamente en los pocillos del análisis. Son células HEp-2 transfectadas de manera estable con el autoantígeno SSA/Ro. 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. Las diapositivas están disponibles con 7 pocillos, 13 pocillos, 14 pocillos, 18 pocillos o 21 pocillos, según las necesidades del laboratorio.

Control positivo de SSA/Ro **CONTROL +:** N° de catálogo 2035-Ro. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra antígenos SSA/Ro. Este suero da una reacción de tinción moteada fina, típica del anti-SSA/Ro que se observa en el sustrato de células HEp-2000® de Immuno Concepts. La expresión se localiza predominantemente en el núcleo, con destacada tinción nucleolar. También se puede observar una débil tinción citoplásmica en las células que expresan el antígeno en exceso. La región cromosómica de las células mitóticas muestra una reacción de tinción negativa.

*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.

Control positivo homogéneo [CONTROL|+]: N° de catálogo 2021. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra el ADN o antígenos nucleares DNP. Este suero da una reacción de tinción homogénea con el sustrato de células HEP-2000® 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. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra Sm o antígenos nucleares RNP. Este suero da una de las reacciones de tinción moteada más habituales que se observan con el sustrato de células HEP-2000® de Immuno Concepts. La región cromosómica de las células mitóticas muestra una reacción de tinción negativa.

Control positivo nucleolar [CONTROL|+]: N° de catálogo 2023. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra antígenos nucleolares. Este suero da una reacción de tinción nucleolar con el sustrato de células HEP-2000® de Immuno Concepts.

Control positivo del centromere [CONTROL|+]: N° de catálogo 2025. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra centrómeros del cromosoma (cinetocoro). Este suero da una reacción de tinción moteada discreta con el sustrato de células HEP-2000® de Immuno Concepts. La región cromosómica de las células mitóticas muestra la misma reacción discreta de tinción moteada.

Suero de control tituable [TC]: N° de catálogo 2026. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 0,5 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG para tratarse como una muestra no diluida del paciente.

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-Ro (9,0 ml), 2075-Ro (23 ml). IgG de cabra antihumana (cadenas pesadas y ligeras) 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. Para usuarios que prefieren un reactivo de anticuerpos fluorescentes que sea específico para IgG, número de catálogo 2009CS (9.0 ml), 2009G-Ro (9.0 ml), 2009GCS-Ro (9.0 ml), 2075CS (23ml), 2075G-Ro (23ml) y 2075GCS-Ro (23ml) están disponibles. Póngase en contacto con su representante de Immuno Concepts para solicitar información.

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 [SOLN|MM]: 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
Placa de Petri u otra cámara de incubación
Papel secante o toallas de papel
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 con 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 paciente 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 reproductibilidad 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 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, éstas deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

Conservación: Los sueros se pueden conservar entre 2 y 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 o 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. Los cinco controles de patrón deben procesarse al menos una vez con cada lote de kits para demostrar la apariencia esperada de los patrones ANA. Si se emplea el análisis de ANA-Ro HEp-2000® para confirmar la presencia de anticuerpos anti-SSA/Ro, el control positivo de SSA/Ro, número de catálogo 2035-Ro, debe realizarse en al menos un portaobjetos de los utilizados ese día.

CONTROL TITULABLE OPCIONAL

Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van “retrocediendo” 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 reproductibilidad (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 reproductibilidad (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 MND 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. La NA no afecta a la sensibilidad del microscopio de luz fluorescente transmitida.
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.

SSA/Ro: Se considera que un suero es positivo para los anticuerpos SSA/Ro si el 10-20% de los núcleos en interfase muestra el patrón de tinción distintivo de SSA/Ro, que aparece como un patrón moteado brillante distintivo con una llamativa tinción de los nucléolos. Son células transfectadas que expresan el antígeno en exceso. El restante 80-90% de los núcleos en interfase puede presentar una fina tinción moteada del núcleo, con o sin tinción fluorescente de los nucléolos.

Títulos: Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van "retrocediendo" 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. Debido al aumento de la concentración del antígeno SSA/Ro en las células que lo expresan en exceso, no es raro ver que estas células se tiñen con títulos muy elevados. Se desconoce la importancia clínica de estos títulos elevados.

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 (33).

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

Detección: Se debe indicar un resultado como positivo o negativo con la dilución de 1:40, y se debe indicar el patrón de tinción nuclear para las muestras positivas.

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 (34).

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 (34).

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 (35).

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 (36).

Centrómero: Un patrón de tinción discretamente moteado es muy sugerente de la variante de la esclerosis sistémica progresiva que se conoce como síndrome CREST[§] (28). 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 las 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).

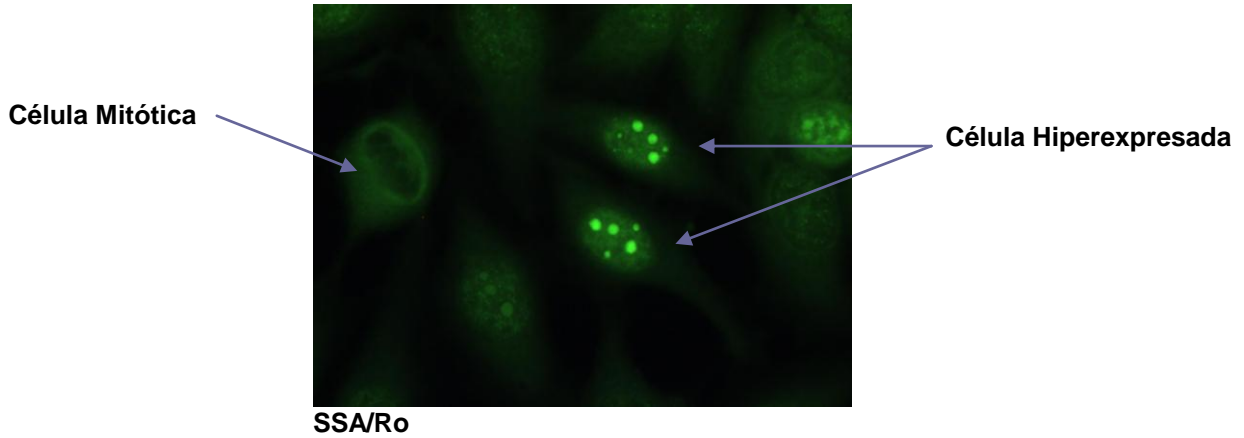
Asociación a enfermedades: Muy sugerentes de la variante de la esclerosis sistémica progresiva que se conoce como síndrome CREST (28).

SSA/Ro: Patrón moteado brillante evidente con tinción destacada de los nucléolos en el 10-20% de los núcleos en interfase. Son células transfectadas que expresan el antígeno en exceso. El restante 80-90% de los núcleos en interfase puede presentar una fina tinción moteada del núcleo, con o 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.

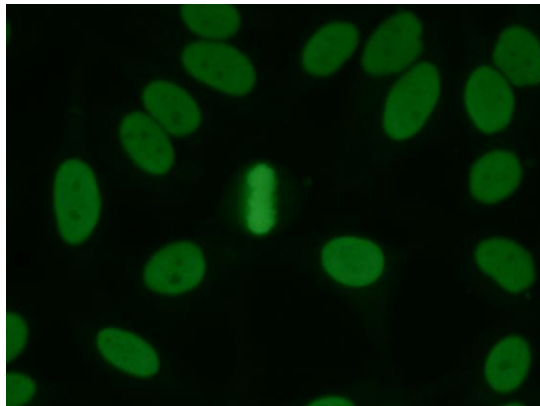
Antígenos nucleares: SSA/Ro (60kD).

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

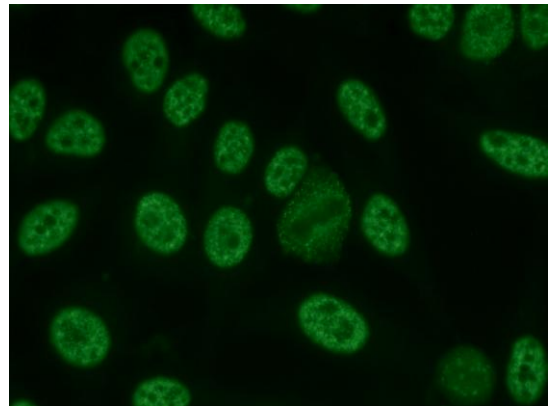
Asociación a enfermedades: Se observa en el 60-70% de los pacientes con síndrome de Sjögren primario, en el 30-40% de los pacientes con LES y en más del 95% con lupus cutáneo subagudo (37).



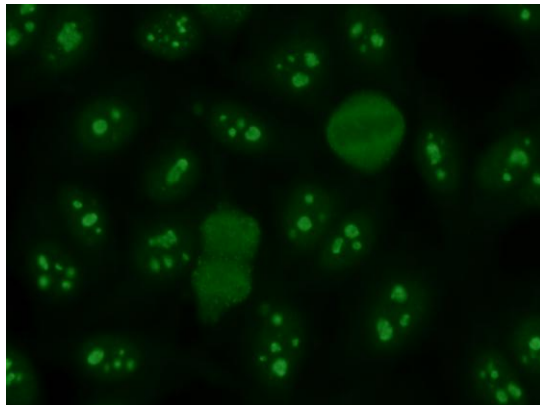
PATRONES BÁSICOS DE TINCIÓN



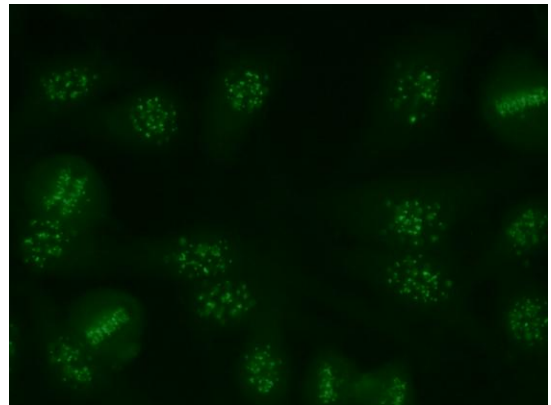
Homogénea



Moteado



Nucleolar



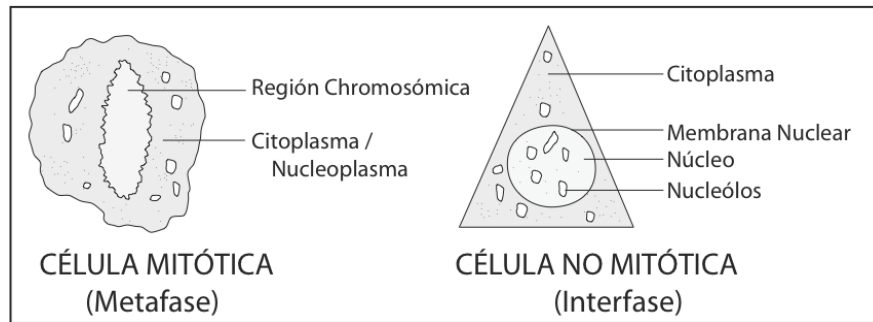
Centrómero

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

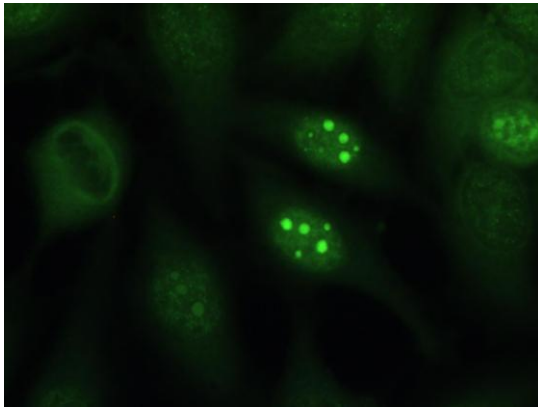
Distinción entre anticuerpos moteados y homogéneos: En ocasiones es difícil distinguir un patrón de tinción moteado fino de otro homogéneo. Si el patrón es homogéneo, habrá una tinción sólida de los cromosomas de las células mitóticas. Si el patrón es estrictamente moteado, la región situada fuera de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

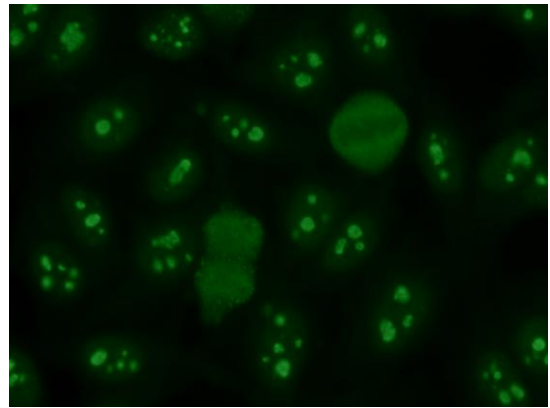
Anticuerpo periférico frente a anticuerpo contra la membrana nuclear: En general, los anticuerpos que muestran un patrón periférico se asocian a antígenos nucleares de ADN/DNP. Los títulos elevados de estos anticuerpos sugieren LES. En sustratos que no incluyen células mitóticas puede ser difícil distinguir 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 (38).

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, el anticuerpo no es ACA y debe designarse como "moteado atípico".

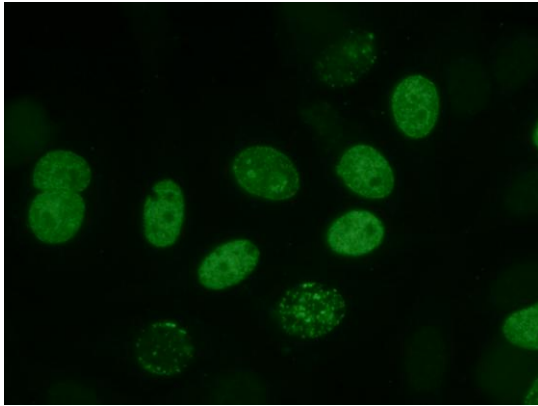
SSA/Ro frente a patrones que se pueden parecer a la tinción por SSA/Ro: La tinción distintiva de SSA/Ro adopta un patrón moteado brillante y delimitado con tinción destacada de los nucléolos en el 10-20% de los núcleos en interfase. El restante 80-90% de los núcleos en interfase puede presentar una fina tinción moteada del núcleo, con o sin tinción fluorescente de los nucléolos. La región cromosómica de las células mitóticas en metafase no se tiñe. El patrón nucleolar se distingue por la tinción moteada grosera y grande de todos los núcleos, por lo general menos de 6 por célula. El patrón de Scl-70 corresponde a una tinción moteada fina y una tinción nucleolar de todos los núcleos en interfase, y la tinción de la región cromosómica de las células mitóticas en metafase. Los anticuerpos contra el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) muestra un moteado variable grosero y fino en el 30-50% de los núcleos en interfase.



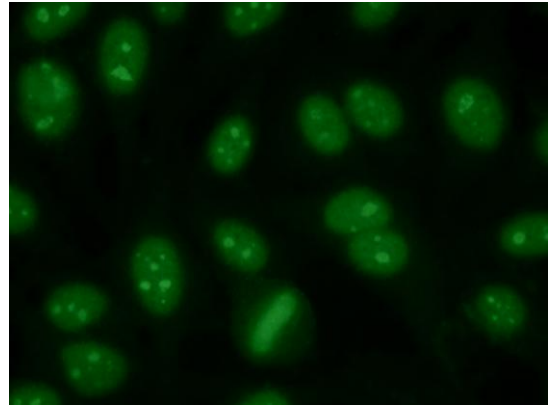
SSA/Ro



Nucleolar



PCNA



Scl-70

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 (40). 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 (41-42). Con el sustrato de células HEp-2 también se han demostrado anticuerpos contra el músculo liso en pacientes con verrugas (43).

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 filamentoso compatible con la localización del retículo endoplásmico en el interior de la célula (50).

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 dicha membrana.

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 (50). Se ha demostrado que los anticuerpos anti-músculo liso son muy específicos de la actina (44-45).

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 (46). 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 (47).
4. Un pequeño porcentaje de pacientes con LES puede no presentar ANA en el análisis por inmunofluorescencia indirecta, pero sí empleando otras técnicas (48).
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).
9. Los autoanticuerpos contra SSA/Ro pueden mostrar un patrón de tinción distintivo en las células transfectadas. Si se observa este patrón, el mismo se considera como prueba confirmadora de la presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro. La ausencia de este patrón distintivo no descarta la posible presencia de anticuerpos contra el SSA/Ro.
10. Debido al exceso de expresión del autoantígeno SSA/Ro en las células HEp-2000[®], las muestras que contienen anticuerpos anti-SSA/Ro muestran títulos superiores en estas células que los que se obtienen en las células HEp-2 no transfectadas. Como quiera que ninguno de los demás autoantígenos de las células HEp-2000[®] se ve afectado por el proceso de transfección, los sueros con otras especificidades de autoanticuerpos no muestran diferencias significativas en los títulos entre la línea de células HEp-2000[®] y las células HEp-2 no transfectadas.

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 (49). 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

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia de detección de anticuerpos antinucleares en la población normal son «Negativos». Como se muestra en la tabla anterior, un porcentaje pequeño de personas normales mostrarán un ANA positivo. Cada laboratorio debe establecer y mantener sus propios valores de referencia (normales), en función del número de pacientes y de otros factores del lugar.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

MUESTRAS NORMALES

Se evaluaron sueros de 500 donantes de sangre sanos, 242 mujeres y 258 varones, ninguno de los cuales presentaba antecedentes de enfermedades reumáticas, en paralelo con células HEp-2 no transfectadas comercializadas y el sistema de análisis de ANA-Ro HEp-2000[®] Colorzyme[®]. En esta población, 36 muestras (7,2 %) dieron positivo en el análisis de anticuerpos antinucleares con una dilución sérica de 1:40. Los patrones de tinción fueron idénticos con los dos sustratos en 34 de las 36 muestras que dieron positivo. Las dos muestras que ofrecieron diferencias correspondieron a mujeres, y en ambas se confirmó que contenían anticuerpos anti-SSA/Ro.

Una de estas muestras mostró una débil reacción moteada fina en las células HEp-2 no transfectadas y la típica tinción “SSA/Ro” en el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®] Colorzyme[®]. La otra muestra dio negativo en las células HEp-2 no transfectadas, pero mostró la típica tinción “SSA/Ro” en el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®]. La especificidad de estas dos muestras por el SSA/Ro fue confirmada por ELISA e inmunotransferencia de Western. Las muestras que dieron negativo en las pruebas de ANA también lo dieron en las de ELISA.

SUEROS DE PACIENTES CON ANTICUERPOS SSA/Ro EXCLUSIVAMENTE

Se evaluaron sueros de 46 pacientes con LES o síndrome de Sjögren con células HEp-2 no transfectadas comercializadas y el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®]. Mediante ELISA e inmunotransferencia de Western se confirmó que todos los sueros contenían anticuerpos contra el autoantígeno SSA/Ro. No se detectaron otros autoanticuerpos en ninguna de estas muestras. Treinta y seis de estas muestras (78%) fueron positivas (patrón moteado) con las células HEp-2 no transfectadas, y las 46 (100%) fueron positivas (patrón de tinción distintivo de SSA/Ro) con el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®].

SUEROS DE PACIENTES CON AUTOANTICUERPOS DISTINTOS DE SSA/Ro

Se evaluaron sueros de 230 pacientes con diversas enfermedades (reumáticas y no reumáticas) en paralelo con células HEp-2 no transfectadas comercializadas y el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®]. Se observó un patrón de tinción aislado en 120 muestras, y patrones mixtos en 110 muestras. En la población total de 230 muestras, 333 patrones de tinción fueron idénticos en los dos sustratos. Veintinueve muestras presentaron el patrón de tinción distintivo de “SSA/Ro” en el sistema de análisis de ANA-Ro HEp-2000[®]. Veintitrés de estas muestras mostraron patrones moteados en las células HEp-2 no transfectadas. Las seis muestras discrepantes (positivas en HEp-2000[®], pero negativas en células HEp-2 no transfectadas) tenían anticuerpos contra SSA/Ro, como se demostró mediante el patrón de tinción distintivo de “SSA/Ro”, pruebas ELISA y confirmación por inmunotransferencia de Western.

COMPARACIONES DE LOS TÍTULOS

Debido al exceso de expresión del autoantígeno SSA/Ro en las células HEp-2000[®], las muestras que contienen anticuerpos anti-SSA/Ro muestran títulos superiores en estas células que los que se obtienen en las células HEp-2 no transfectadas. Como quiera que ninguno de los demás autoantígenos de las células HEp-2000[®] se ve afectado por el proceso de transfección, los sueros con otras especificidades de autoanticuerpos no muestran diferencias significativas en los títulos entre la línea de células HEp-2000[®] y las células HEp-2 no transfectadas.

REPRODUCTIBILIDAD DE LOS TÍTULOS

Diez muestras elegidas entre los controles de los CDC y otros sueros locales bien caracterizados, fueron sometidas a tres números de lote diferentes de portaobjetos HEp-2000[®], en tres ocasiones diferentes. No se dio ningún caso de que una muestra negativa diera resultados positivos. Todos los títulos fueron inferiores al doble de dilución del título medio establecido para todas las muestras evaluadas.

CONFIRMACIÓN DE ANTICUERPOS SSA/Ro

En un gran laboratorio de reumatología de referencia, se analizaron con el sistema de análisis de ANA-Ro por inmunofluorescencia HEp-2000[®] muestras de suero de 349 pacientes que habían dado positivo en la detección de ANA. En esta población seleccionada, 239 muestras presentaron el patrón de tinción distintivo de SSA/Ro. Se obtuvieron resultados ELISA positivos para anticuerpos SSA/Ro en 238 (99,6%) de estas muestras. Otras 79 muestras presentaron intensos patrones moteados y/o homogéneos, y dieron positivo en las pruebas ELISA para anticuerpos SSA/Ro. Por

consiguiente, si se observa el patrón distintivo de SSA/Ro, el mismo confirma la presencia de anticuerpos SSA/Ro, pero la ausencia de dicho patrón no descarta la presencia de esos anticuerpos. En los estudios que hemos descrito, hemos examinado un total de 429 sueros que contenían anticuerpos SSA/Ro confirmado por ELISA y/o inmunotransferencia de Western, y que presentaron el patrón de tinción distintivo de SSA/Ro en la línea de células HEp-2000[®] transfectadas. También hemos visto muestras que contienen anticuerpos SSA/Ro pero no que muestren el patrón de tinción distintivo de SSA/Ro, porque los elevados niveles de otros autoanticuerpos (habitualmente anticuerpos anti-ADN o anti-Sm/RNP) enmascaran el patrón SSA/Ro. Por consiguiente, si se observa el patrón distintivo de SSA/Ro, el mismo confirma la presencia de anticuerpos SSA/Ro, pero la ausencia de dicho patrón no descarta la presencia de esos anticuerpos.

UTILICE CON IMAGE NAVIGATOR[®]

El Image Navigator[®] es el sistema de microscopio semiautomatizado de Immuno Concepts para leer los portaobjetos de fluorescencia de ANA HEp-2000[®]. Al comparar el Image Navigator[®] con la lectura convencional de portaobjetos de fluorescencia de ANA se encontraron los siguientes datos:

Coincidencia positiva, 99,8 %; coincidencia negativa, 98,9 %; coincidencia global, 99,4 % (n = 739 muestras).

La sensibilidad clínica para detectar ANA en pacientes que presentan lupus eritematoso sistémico fue del 93,8 % con una lectura convencional y 94,1 % para el Image Navigator[®]. En 301 pacientes que presentan enfermedades del tejido conectivo, la sensibilidad clínica fue del 82,7 % con una lectura convencional y 83,1 % para el Image Navigator[®].









En un grupo de 296 pacientes con enfermedades que no son del tejido conectivo y 142 sujetos de control saludables (total n = 438), la especificidad clínica demostró ser de 87,3 % con una lectura convencional y 87,4 % con el Image Navigator[®].

BIBLIOGRAFICI

- 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.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
- 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.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
- 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.
- 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.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
- 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.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- 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.
- 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.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- 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.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
- 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.
- Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M.: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173, 1984.
- Maddison P.J., Provost T.T., Reichlin M.: Serological findings in patients with "ANA negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
- Itoh Y., Rader M.D., Reichlin M.: Heterogeneity of the Ro/SS-A antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51, 1990.
- Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
- Miyachi, K., Fritzier, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immunol.* 121:2228-2234, 1978.
- 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.
- McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzier, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
- 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.
- Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
- Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
- McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.

36. Ritchie, R.F. Antinucleolar Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. N.Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
 37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. Rheum. Dis. Clin. North Am. 18:551-570, 1992.
 38. 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.
 39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. Arthritis Rheum. 27:92-96, 1984.
 40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. Am. J. Pathol. 72:473-488, 1973.
 41. 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.
 42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
 43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
 44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
 45. 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.
 46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
 47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
 48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
 49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.
 50. McCarty, G.A., Valencia, D.W., Fritzler, M. J. Antinuclear Antibodies: Contemporary Techniques and Clinical Application to Connective Tissue Diseases. New York, Oxford University Press, 1984.

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		

Solo receta: únicamente para uso con receta

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-RO POR INMUNOFLUORESCENCIA HEP-2000®

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 entre 2 y 25°C durante cuatro semanas como máximo.
- 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTE**

Selección: Disuelva las muestras de paciente 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.).
- 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. Si va a realizar una valoración semicuantitativa deberá seleccionar, el control titulable con número de catálogo 2026 con cada lote de muestras de paciente. Todos los controles de patrón deben procesarse con cada número de lote de kits para demostrar la apariencia esperada de los patrones ANA. Si se emplea el análisis de ANA-Ro HEP-2000® para confirmar la presencia de anticuerpos anti-SSA/Ro, el control positivo de SSA/Ro, número de catálogo 2035-Ro, debe realizarse en al menos un portaobjetos de los utilizados ese día.

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, entre 18 y 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 brevemente con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.
- 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 de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.
- 7. REACTIVO FLORESCENTE PARA DETECTAR ANTICUERPOS (cubra los pocillos con 12-14 gotas)**

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 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, entre 18 y 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 brevemente 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 de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales, cuando no se utiliza contratinción. Contratinción opcional: Añada de 5 a 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 sumérjalos de 3 a 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 ó 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.
- 12. LECTURA DEL PORTAOBJETOS**

Si el portaobjetos debe leerse con un microscopio de fluorescencia convencional, puede leerse inmediatamente, mediante el procedimiento estándar del laboratorio. Un usuario capacitado familiarizado con interpretación y patrones de fluorescencia de ANA deber ser quien siempre lea los portaobjetos. Consulte al proveedor del microscopio de fluorescencia para conocer las instrucciones de uso del microscopio.

Si se va a leer el portaobjetos con el Image Navigator®, el sistema de microscopía y captura de imagen automatizado de Immuno Concepts, consulte el Manual del operador del sistema de Image Navigator®. El Image Navigator® debe ser operado únicamente por un usuario capacitado.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

* Los laboratorios que desean detectar una dilución que no sea la dilución recomendada deben validar el uso de la dilución de detección alternativa en su población de pacientes.

