



## **SISTEMA DE PRUEBAS DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES LKS PARA ROEDORES HISTOFLUOR®**

***Para uso diagnóstico in vitro***

***Para uso profesional***

**USO PREVISTO:** Este es una prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos para la detección cualitativa y semicuantitativa de autoanticuerpos IgG en suero humano por microscopía fluorescente manual o mediante el microscopio de fluorescencia semiautomatizado Image Navigator®. Este sistema de pruebas debe utilizarse como asistencia para la detección de autoanticuerpos antimitocondriales (AMA), autoanticuerpos anticélulas parietales (APCA), y autoanticuerpos antimúsculo liso (ASMA) relacionados con hepatitis autoinmunitaria de tipo 1, colangitis biliar primaria, y anemia perniciosa o gastritis autoinmune en conjunto con otros resultados clínicos y de laboratorio. Un operador capacitado debe confirmar los resultados que se generen en el software y dispositivo semiautomatizado Image Navigator®.

### **RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST**

Los autoanticuerpos presentes en humanos van dirigidos contra una diversidad de antígenos. Muchos de estos antígenos se conservan muy bien, y se encuentran epítomos casi idénticos en los tejidos de animales y de humanos. Por tanto, el uso de tejidos animales para detectar estos anticuerpos es un procedimiento de laboratorio que lleva utilizándose desde hace mucho tiempo. Muchos de los autoanticuerpos detectados en tejidos animales están estrechamente relacionados con enfermedades autoinmunitarias en humanos. La detección y determinación cuantitativa de anticuerpos específicos permite diagnosticar y realizar el seguimiento de enfermedades autoinmunitarias específicas (1,2).

### **PRINCIPIOS DEL TEST**

El Sistema de prueba LKS en roedores Histofluor® de Immuno Concepts emplea la técnica de anticuerpos fluorescentes indirecta descrita por primera vez por Weller y Coons (3). Las muestras de los pacientes se incuban con sustrato antigénico (hígado/riñón/estómago de roedor), para permitir la unión específica de los autoanticuerpos a los componentes celulares. Si hay autoanticuerpos presentes, se forma un inmunocomplejo estable. Tras el lavado para retirar los anticuerpos no específicos y no unidos, el sustrato se incuba con un anticuerpo antihumano conjugado con fluoresceína. Si los resultados son positivos, se forma un complejo de tres partes estable compuesto por el anticuerpo fluorescente unido al autoanticuerpo humano, que se adhiere al antígeno celular. Este complejo puede verse con un microscopio fluorescente. En muestras con resultados positivos, las células mostrarán una fluorescencia verde-manzana con un patrón de tinción característico de la distribución antigénica particular dentro de las células. Si la muestra no presenta autoanticuerpos, las células no mostrarán un patrón de fluorescencia claramente apreciable.

## COMPONENTES DEL TEST (MATERIALES SUMINISTRADOS)

**Uso:** todos los componentes se suministran listos para su uso y no se requiere la división alícuota ni la reconstitución (salvo el tampón PBS, que debe disolverse en agua destilada o desionizada antes de utilizarse).

**Conservación:** todos los componentes se pueden conservar refrigerados a una temperatura de entre 2 y 10 °C. Tras la reconstitución, el tampón PBS debe conservarse en frascos con tapón de rosca a una temperatura de entre 2 y 25 °C. El medio de montaje puede almacenarse a una temperatura de 2 a 25 °C.

**Estabilidad:** todos los componentes son estables 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 **PORTAOBJETOS**:** Secciones delgadas (aproximadamente 4-5 micrómetros) de hígado, riñón, estómago o riñón y estómago de roedor. Los tejidos están colocados en una mezcla patentada de acetona, alcoholes, y otros solventes orgánicos a fin de conservar las proteínas del tejido en sus configuraciones nativas. Los portaobjetos están disponibles con cuatro celdas (ratón, número de catálogo 12004-02; rata, número de catálogo 12004-03) y con ocho celdas (ratón, número de catálogo 12008-02; rata, número de catálogo 12008-03). Los KS portaobjetos están disponibles con cuatro celdas (ratón, número de catálogo 12004-04; rata, número de catálogo 12004-05) y con ocho celdas (ratón, número de catálogo 12008-04; rata, número de catálogo 12008-05).

**Control específico positivo de anticuerpos antimitocondriales **CONTROL|+**:** N.º de catálogo 12021-02 (1,0 ml) - AMA. Frasco cuentagotas listo para usar que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra antígenos mitocondriales. Este suero presenta un patrón de tinción antimitocondrial positivo en el sustrato de tejido de roedor.

**Suero de control negativo **CONTROL|-**:** N.º de catálogo 12031. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control negativo humano. Este control puede presentar una tinción fluorescente débil con un patrón no apreciable.

**Reactivo de anticuerpos fluorescentes **CONJ|FITC**:** N.º de catálogo 12009-02 (9,0 ml), 12075-02 (23 ml). IgG (gamma) de cabra antihumana conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los kits de test completos contienen frascos cuentagotas de precisión con 9,0 ml de reactivo listo para su uso para cada 10 portaobjetos.

**Control positivo opcional **CONTROL|+**:**

Nº de catálogo 12022-02 (0,5 ml) – Anticuerpo Celular Anti-Parietal (APCA). Frasco cuentagotas listo para usar que contiene 0,5 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra antígenos de células parietales. Este suero presenta un patrón celular antiparietal positivo en el sustrato de tejido de roedor.

Nº de catálogo 12023-02 (0,5 ml) – Anticuerpo Antimúsculo Liso (ASMA). Frasco cuentagotas listo para usar que contiene 0,5 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos IgG específicos contra antígenos de músculo liso. Este suero presenta un patrón de tinción antimúsculo liso positivo en el sustrato de tejido de roedor.

**Suero de control tituable opcional **TC**:**

Nº de catálogo 12261-02 (0,25 ml) – AMA. Frasco listo para usar que contiene 0,25 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos antimitocondriales para tratarse como una muestra no diluida del paciente. Consulte la etiqueta del frasco para ver el valor de valoración.

Nº de catálogo 12262-02 (0,25 ml) - APCA. Frasco listo para usar que contiene 0,25 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos anticélulas parietales para tratarse como una muestra no diluida del paciente. Consulte la etiqueta del frasco para ver el valor de valoración.

Nº de catálogo 12263-02 (0,25 ml) - ASMA. Frasco listo para usar que contiene 0,25 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos antimúsculo liso para tratarse como una muestra no diluida del paciente. Consulte la etiqueta del frasco para ver el valor de valoración.

### ELEMENTOS NO REACTIVOS

**Polvo tampón PBS **PWDR|PBS**:** N.º de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfatos (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene suficiente polvo tampón para producir 1 litro. (Los kits de test completos contienen una bolsa de polvo tampón para cada cinco portaobjetos).

**Preparación:** disuelva una bolsa de polvo tampón en 1 litro de agua desionizada o destilada, tape y conserve a una temperatura de entre 2 y 25 °C durante un periodo máximo de cuatro semanas o hasta que se aprecien signos de contaminación o se produzca algún cambio visible.

**Medio de montaje semipermanente** **SOLN|MM**: N.º de catálogo 1111. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 5,0 ml de medio de montaje basado en glicerol.

**Cubreobjetos** **CVSLP**: N.º de catálogo 1042. Cada paquete contiene 10 cubreobjetos de cristal n.º 1 de 24x64 mm.

## OTROS MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)

Pipetas volumétricas para dispensar volúmenes de 30 a 40 µl  
Cubetas Coplin o cubetas de tinción  
Botella exprimible o pipetas de Pasteur  
Pipetas serológicas  
Recipientes de un litro (para el tampón PBS)  
Agua destilada o desionizada  
Tubos de ensayo para preparar las diluciones de suero  
Papel secante o absorbente  
Cámara incubadora  
Guantes desechables  
Cronómetro  
Microscopio fluorescente equipado con un filtro excitador de 495 nm y un filtro de barrera de 515 nm

## PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de origen humano utilizados para este producto han sido analizados mediante los métodos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) y han dado resultados negativos (no reactivos repetidamente) para 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 del virus de la hepatitis B (HBsAg). Sin embargo, ningún método de análisis puede garantizar completamente que no se encuentren presentes estos virus u otros agentes infecciosos. Por tanto, todos los materiales del kit se deben manipular como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de pacientes se deben manipular según el nivel 2 de bioseguridad, tal como se recomienda en el manual de los Centros para el Control de las Enfermedades y de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. para toda muestra de suero o sangre humanos potencialmente infecciosos: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* ("Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos"), edición de 1999.
3. La dilución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede producir resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,09 %) como conservante en algunos reactivos. La azida sódica puede reaccionar con las conducciones de plomo o de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Cuando se eliminen los reactivos, se deben purgar las tuberías con grandes cantidades de agua corriente para evitar que queden residuos en las mismas. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. En el caso de tener que utilizar sueros hemolizados o de aspecto lechoso por exceso de lípidos, inactive térmicamente el suero durante 30 minutos a 56 °C para obtener unos resultados óptimos. No debe utilizarse suero con contaminación microbiana.
7. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
8. Evite siempre las salpicaduras y la generación de aerosoles.
9. Si los tiempos y temperaturas de incubación no son los indicados, los resultados pueden ser erróneos.
10. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados erróneos.
11. Se deben lavar y enjuagar a fondo los elementos de vidrio reutilizables para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos estos elementos deben estar limpios y secos antes de su uso.
12. Todos los reactivos, portaobjetos y muestras deben encontrarse a temperatura ambiente (18 a 25 °C) antes de su uso.
13. Debe utilizar guantes desechables cuando manipule las muestras y los reactivos, y lavarse bien las manos una vez que haya terminado.
14. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados erróneos.
15. No pipetee nunca con la boca, y evite el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y las mucosas. Si se produce el contacto, lave la superficie contactada con jabón germicida y aclárela con grandes cantidades de agua.

## OBTENCIÓN DEMUESTRAS

**Extracción:** la muestra ideal es el suero. Se deben extraer aproximadamente 5 ml de sangre de forma aséptica mediante venopunción utilizando un tubo de vacío estéril u otro sistema de extracción adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18 a 25 °C). Se debe separar el suero del coágulo mediante una centrifugadora cuanto antes para minimizar la hemólisis.

**Sustancias que pueden interferir:** Los sueros que presenten un alto grado de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano no se deben utilizar, puesto que estas condiciones pueden causar resultados anómalos. Las muestras que contengan partículas visibles se deben aclarar mediante centrifugado antes de la prueba.

**Conservación:** Los sueros se deben conservar a temperaturas de entre 2 y 10 °C durante una semana como máximo. Si se retrasan las pruebas, se deben congelar los sueros a temperaturas de -20 °C o inferiores. No se deben utilizar frigoríficos o congeladores con sistemas de eliminación automática de la escarcha.

**ATENCIÓN:** Si las muestras de los pacientes se congelan y descongelan varias veces se pueden dar falsos negativos y positivos en los resultados.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### CONTROL DE CALIDAD

Los controles positivos, negativos y PBS deben probarse una vez por proceso. El control positivo debe presentar, en las estructuras de tejido adecuadas, un patrón fluorescente verde-manzana brillante que sea claramente apreciable, característico del suero de control utilizado. El control negativo debe presentar, tanto en el citoplasma como en el núcleo, un patrón no apreciable de tinción fluorescente verde claro, de baja intensidad y no específico. El control PBS se utiliza para observar una tinción no específica del reactivo de anticuerpo y no debe mostrar ninguna fluorescencia verde. Si los controles no dan los resultados descritos, la prueba no será válida y deberá repetirse.

### CONTROLES TITULABLES OPCIONALES

Los sueros de control titulables deben utilizarse para monitorear la reproducibilidad entre lotes y entre procesos. No están diseñados como medida de la sensibilidad general o especificidad del ensayo.

Para interpretar los títulos, muchos laboratorio empiezan por el pocillo que contiene la muestra más diluida, y van “retrocediendo” hasta la dilución 1:20.

Se establecieron en nuestro laboratorio la media de valoración y el rango de valoración ( $\pm$  una dilución en cada lado de la media), y se exponen como guía. Se provee este control para permitirle a cada laboratorio evaluar la reproducibilidad (precisión) de su prueba. Dado que este control no pretende ser un indicativo de la exactitud de la valoración, cada laboratorio debe establecer su propio criterio de media de valoración para esta muestra y debe usar esta información para evaluar la reproducibilidad entre procesos (precisión).

Mediante múltiples pruebas de control tituable, utilizar el Sistema de pruebas LKS de anticuerpos fluorescentes para roedores Histofluor<sup>®</sup> de Immuno Concepts, se ha establecido una media de valoración para cada número de lote. El número de lote, la media de valoración y el rango de valoración ( $\pm$  una dilución doble en cada lado de la media) se exponen en la etiqueta del frasco y deben usarse como guía al realizar la prueba.

Los valores obtenidos en nuestro laboratorio pueden diferir de los valores suyos.

Algunos de los factores que pueden influir en los resultados son, entre otros, los siguientes:

1. El tipo de fuente de luz utilizado. Las fuentes de luz de mercurio producirán una mayor energía de excitación a 495 nm que las luces de cuarzo/halógenas. La energía de excitación de las fuentes de luz de mercurio de 50 vatios, 100 vatios y 200 vatios a 495 nm varía muy poco. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas de 100 vatios generarán una mayor energía de excitación a 495 nm que las luces de cuarzo/halógenas de 50 vatios.
2. El estado y la antigüedad de la fuente de luz. Esto afecta sobre todo a las fuentes de luz de mercurio. Estas luces muestran, por lo general, una reducción gradual de la energía de excitación a 495 nm antes de apagarse. Esta reducción gradual de la energía de excitación puede provocar una pérdida significativa de la sensibilidad a lo largo de varias semanas. Si se lleva un registro del tiempo, este problema puede evitarse. Para obtener unos mejores resultados, sustituya las bombillas de mercurio de 50 vatios cada 100 horas y las de 100 o 200 vatios, cada 200 horas. Las fuentes de luz de cuarzo/halógenas no suelen presentar una reducción gradual de la energía de excitación antes de apagarse.

3. El tipo de filtro excitador empleado. Los filtros de excitación por interferencia ofrecen una mayor sensibilidad a longitudes de onda mucho menores que los filtros de excitación por absorción. Consulte el manual del microscopio fluorescente o póngase en contacto con el representante de ventas para obtener más información.
4. La correcta alineación de la trayectoria del haz luminoso. Consulte el manual del microscopio fluorescente para obtener instrucciones.
5. La apertura numérica del objetivo. Con luz fluorescente incidente (Epi), la fluorescencia aumenta exponencialmente a medida que la apertura numérica (AN) del objetivo se incrementa de forma aditiva. Esto puede provocar que un objetivo de 40X con una AN de 0,65 lea una o varias diluciones con una menor resolución que un objetivo de 40X con una AN de 0,85. La apertura numérica se indica en el lateral del objetivo.
6. Filtro de supresión. Los filtros de supresión reducen las longitudes de onda de excitación específicas y pueden utilizarse para reducir la sensibilidad. Consulte el manual del microscopio fluorescente o póngase en contacto con el representante de ventas para obtener más información.
7. Precisión y exactitud de la técnica de dilución, el equipo y el rendimiento de los procedimientos del test.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS PACIENTES

Se recomienda un aumento total de 100X para la detección positiva/negativa, mientras que se recomienda un aumento total de 200X para el reconocimiento de patrones.

**Negativo:** los resultados de un suero se consideran negativos si no se aprecia claramente un patrón. Es posible que el tejido muestre una tinción débil, pero sin un patrón claramente apreciable.

**Positivo:** los resultados de un suero se consideran positivos si en el tejido se aprecia claramente un patrón de tinción.

**Títulos:** Al leer los títulos, muchos laboratorios comienzan con el recipiente que contiene la muestra más diluida y leen "al revés" hasta la dilución 1:20. El primer recipiente en el que se puede ver un patrón claramente discernible es el punto final del título. Recomendamos esta técnica para determinar los puntos finales del título. Es importante que la intensidad de la tinción no se confunda con la presencia o ausencia de anticuerpos antimitocondriales o antiparietales. El factor clave a tener en cuenta para determinar si una determinada dilución de suero es positiva es la aparición de un patrón claramente discernible, independientemente de la intensidad de la tinción.

## INFORMES SOBRE LOS RESULTADOS

**Detección:** se debe indicar el patrón de tinción y si los resultados son positivos o negativos en la dilución 1:20.

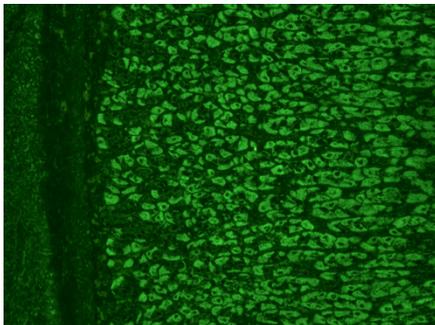
**Valoración:** los resultados deben presentarse como la última dilución en serie en la que se observan manchas claramente perceptibles. Los resultados con una reacción fuerte a la dilución 1:320 deben indicarse como superiores a 1:320.

### DETECCIÓN DEL PATRÓN

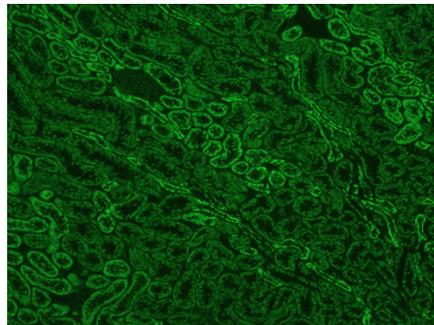
**Anticuerpos antimitocondriales (AMA):** presencia de tinción citoplásmica granular en las células de Kupffer y los hepatocitos en el corte de hígado; presencia de tinción citoplásmica granular en los túbulos renales, con la tinción más intensa en los túbulos distales, que contienen más mitocondrias que los túbulos proximales; presencia de tinción granular citoplásmica en las células gástricas, con tinción más intensa en las células parietales que en las células principales.

**Antígeno:** el antígeno que se detecta con más frecuencia en las mitocondrias es el M2, que es un complejo de varios péptidos antigénicos del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH).

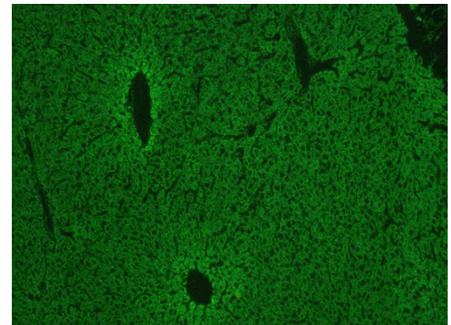
**Asociación con enfermedades:** se ha detectado la presencia de AMA en el 95 % de los pacientes con cirrosis biliar primaria (CBP) (4,5).



AMA en estómago de roedor



AMA en riñón de roedor

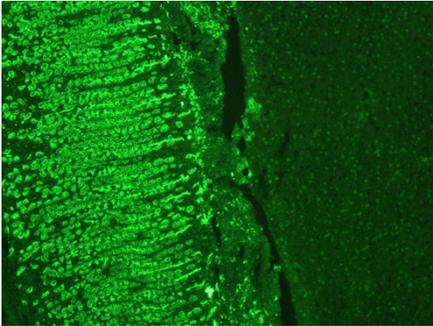


AMA en hígado de roedor

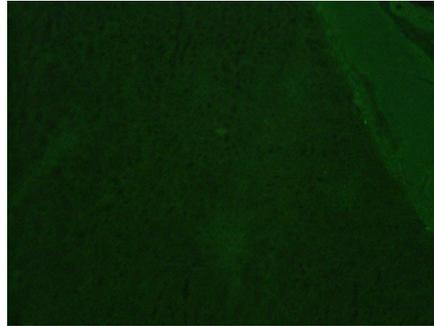
**Anticuerpos contra células antiparietales (APCA):** en el tejido del estómago se aprecia una tinción citoplásmica granular brillante de las células parietales en un patrón lineal paralelo, sin tinción de las células principales. El antígeno no se manifiesta en el riñón ni en el hígado de roedor, por lo que se consideran que los resultados para estos tejidos son negativos, con solo fluorescencia de fondo.

**Antígeno:** el antígeno es la bomba de protones ATPasa-H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

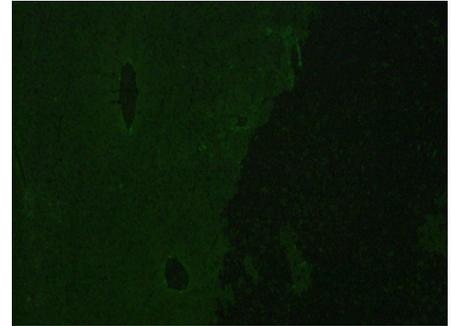
**Asociación con enfermedades:** los APCA están presentes en más del 90 % de los pacientes con anemia perniciosa. A menudo, la gastritis atrófica suele preceder a la anemia perniciosa, con lo que también se observa la presencia de estos anticuerpos en pacientes con gastritis atrófica autoinmunitaria (6,7).



APCA en estómago de roedor



APCA en riñón de roedor (negativo)

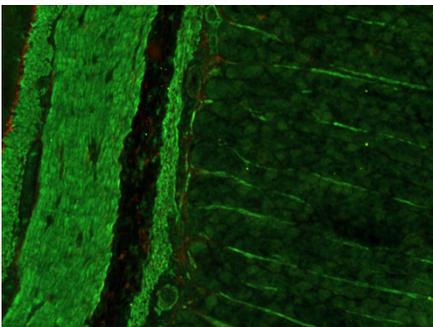


APCA en riñón de roedor (negativo)

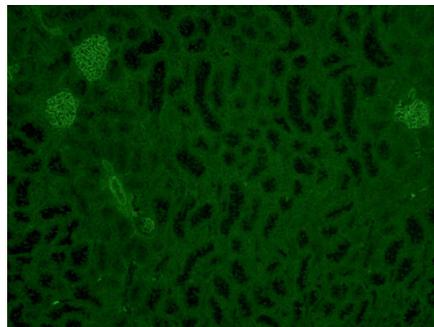
**Anticuerpo antimúsculo liso (ASMA):** El tejido del estómago muestra una tinción brillante de las fibras de músculo liso en la capa muscular propia, la capa muscular de la mucosa, la zona glandular intergástrica y las capas de músculo liso de las arterias. El tejido del hígado presenta una tinción brillante de las fibras de músculo liso de las paredes de las arterias. En el riñón, los elevados valores de anticuerpos antiactina pueden reaccionar con las fibras de tubulina en los glomérulos.

**Antígeno:** la actina es el antígeno más importante clínicamente, aunque también se han detectado anticuerpos contra la vimentina, tubulina, desmina y otras proteínas en las fibras de músculo liso.

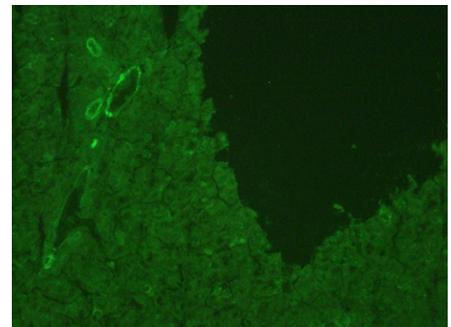
**Asociación con enfermedades:** hepatitis crónica autoinmunitaria (tipo 1) (8-10).



ASMA en estómago de roedor



ASMA en riñón de roedor



ASMA en hígado de roedor

## LIMITACIONES DEL TEST

1. No se puede realizar ningún diagnóstico basado únicamente en la detección de anticuerpos en tejidos de roedor. El médico debe interpretar estos resultados de forma conjunta con el historial y los síntomas del paciente, con los datos obtenidos en la exploración física y con otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar el tratamiento basándose únicamente en un resultado positivo en el test de anticuerpos. Se deben tener en cuenta también las indicaciones clínicas, otros resultados de laboratorio y los indicios que observe el médico en la exploración.
3. Aunque una reacción positiva puede indicar una enfermedad del tejido conectivo, no debe considerarse como un diagnóstico, sino que debe verse como una parte de toda la historia clínica del paciente.
4. Los patrones de tinción pueden cambiar con la valoración progresiva del suero. Este fenómeno se debe, por lo general, a la presencia de más de una afección.
5. Como los microscopios fluorescentes ofrecen varias opciones, se recomienda normalizar las fuentes de luz, los filtros y las ópticas cuando se comparen los valores de pacientes entre distintos laboratorios.
6. Immuno Concepts recomienda utilizar células cultivadas y transfectadas (HEp-2000<sup>®</sup>) para determinar los ANA y no aconseja usar tejido de roedor para la detección o identificación de los ANA.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

El sistema de pruebas LKS para roedores Histofluor<sup>®</sup> se ha comparado con otros kits de pruebas de anticuerpos inmunofluorescentes para tejidos de roedores que se encuentran en distribución comercial y usan 170 muestras clínicamente caracterizadas. Se utilizaron tres sitios para probar las muestras y tres operadores para leerlas en cada sitio. Los datos que aparecen a continuación se obtuvieron utilizando microscopía fluorescente convencional. Los valores de concordancia representan el consenso adjudicado de las mejores dos de tres decisiones de los tres sitios.

### Tejido de Rata

Concordancia positiva: 92.3 % (79.0 - 98.1)  
 Concordancia de patrón: 92.3 % (79.0 - 98.1)  
 Concordancia negativa: 97.8 % (93.4 - 99.5)  
 Concordancia general: 98.2 % (94.7 - 99.6)

### Tejido de Ratón

Concordancia positiva: 94.4 % (80.9 - 99.4)  
 Concordancia de patrón: 94.4 % (80.9 - 99.4)  
 Concordancia negativa: 98.5 % (94.5 - 99.9)  
 Concordancia general: 98.8 % (95.5 - 99.9)

### UTILICE CON IMAGE NAVIGATOR<sup>®</sup>

El Image Navigator<sup>®</sup> es el sistema de microscopio semiautomatizado de Immuno Concepts para leer los portaobjetos de fluorescencia de Histofluor<sup>®</sup>. Se llevó a cabo una comparación de la lectura de monitoreo del Image Navigator<sup>®</sup> con la lectura convencional de portaobjetos con tejido de roedor fluorescente con el sistema de prueba LKS para roedores Histofluor<sup>®</sup>, donde se utilizaron 170 muestras caracterizadas clínicamente, analizadas en tres sitios y leídas por tres operadores en cada sitio. Los valores de concordancia representan el consenso adjudicado de las mejores dos de tres decisiones de los tres sitios.

### Tejido de Rata

Concordancia positiva: 100 % (87.9 - 100)  
 Concordancia de patrón: 100 % (87.9 - 100)  
 Concordancia negativa: 100 % (96.6 - 100)  
 Concordancia general: 100 % (97.3 - 100)

### Tejido de Ratón

Concordancia positiva: 100 % (88.5 - 100)  
 Concordancia de patrón: 100 % (88.5 - 100)  
 Concordancia negativa: 100 % (96.7 - 100)  
 Concordancia general: 100 % (97.3 - 100)

La sensibilidad clínica para la detección de autoanticuerpos en pacientes con anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 o colangitis biliar primaria se muestra en las tablas que aparecen a continuación. Para estos estudios, se utilizó una disolución de valor límite de 1:20 para determinar las muestras positivas.

Sensibilidad Clínica (95% CI)		Higado/Riñón/Estómago de Rata de Histofluor <sup>®</sup>			
		Convencional	% Positive	Image Navigator <sup>®</sup>	% Positive
Anemia Perniciosa	12	6	50.0% (25.4-74.6)	6	50.0% (25.4-74.6)
Hepatitis Autoinmunitaria de Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Colangitis Biliar Primaria	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

Sensibilidad Clínica (95% CI)		Higado/Riñón/Estómago de Ratón de Histofluor®			
Diagnóstico	N	Convencional	% Positive	Image Navigator®	% Positive
Anemia Perniciosa	12	5	41.7% (19.3-68.1)	5	41.7% (19.3-68.1)
Hepatitis Autoinmunitaria de Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Colangitis Biliar Primaria	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

La especificidad clínica se determinó en un grupo de 121 pacientes con enfermedades autoinmunitarias diferentes de anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria de tipo 1 o colangitis biliar primaria. Los datos para estas comparaciones se muestran en la tabla que aparece a continuación. Para estos estudios, se utilizó una disolución de valor límite de 1:20 para determinar las muestras positivas.

Especificidad Clínica (95% CI)		Higado/Riñón/Estómago de Ratón de Histofluor®			
Grupo	N	Convencional	% Negative	Image Navigator®	% Negative
Pacientes autoinmunitarios	121	114	94.2% (88.3-97.4)	114	94.2% (88.3-97.4)

Especificidad Clínica (95% CI)		Higado/Riñón/Estómago de Rata de Histofluor®			
Grupo	N	Convencional	% Negative	Image Navigator®	% Negative
Pacientes autoinmunitarios	121	113	93.4% (87.3-96.8)	113	93.4% (87.3-96.8)

**Precisión:** Según los requisitos de CLSI EP05-A3, se analizaron trece muestras en triplicado, en diez eventos y en tres sitios independientes. El conjunto de muestras incluyó cuatro muestras positivas de AMA, cuatro muestras positivas de APCA, cuatro muestras positivas de ASMA, y una muestra negativa. Dos lectores leyeron cada resultado de manera convencional y con el Image Navigator®. A fin de demostrar la información en un formato semicuantitativo, la concordancia de resultado del título aparece a continuación para las muestras dentro de cada sitio y entre cada sitio. Todas las concordancias fueron de >90.0%.

Reproducibilidad con lecturas múltiples, en múltiples sitios (% de concordancia con 95 % de CI)								
Sustrato	Medida	n	Convencional			Monitor (Semiautomatizado)		
			Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3	Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3
RATA	Positiva	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Patrón	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	± 1 Titer	720	95.4% (93.6-96.7)	95.8% (94.1-97.1)	96.5% (94.9-97.7)	95.3% (93.5-96.6)	95.3% (93.5-96.6)	96.7% (95.1-97.8)
RATÓN	Positiva	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Patrón	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	± 1 Titer	720	94.9% (93.0-96.3)	97.8% (96.4-98.7)	94.4% (92.5-95.9)	96.8% (95.2-97.9)	98.9% (97.8-99.5)	96.5% (94.9-97.7)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nakamura RM, Chisari FV, Edington TS. Laboratory tests for diagnosis of autoimmune diseases. Prog Clin Pathol. 1975;6:177-203.
2. Craig WY, Ledue TB, Collins MF, et al. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. Ciin Chem Lab Med. 2006;44:1283-1286.
3. Weller TH, Coons AH Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc Soc Exp Biol Med. 1954;86:789-794.
4. Jones DEJ. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. J Clin Pathol. 2000;53:813-821.
5. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. World J Hepatol. 2015;7:926-941.
6. Toh B-H. Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. Immunol Res. 2017;65:326-330.
7. De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh B-H. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. NEJM. 1983;309:625-629.
8. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies and autoimmune hepatitis. J Autoimm. 2013;46:17-24.
9. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target the auto antigens in autoimmune hepatitis: an overview. Eur J Intern Med. 2002;13:293-303.
10. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999;30:394-401.

En caso de daño en el embalaje de protección, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de su uso.



Fabricante



Representante autorizado en la Unión Europea



Límite de temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Aparato médico para el diagnóstico in vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover (Alemania)



Solo receta: únicamente para uso con receta

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
Asistencia técnica EE. UU.: 1.800.251.5115 Fuera de EE. UU.: 1.916.363.2649  
Correo electrónico: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

# PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE FLUORESCENCIA DE TEJIDOS DE ROEDORES HISTOFLUOR®

**NOTA:** Si el laboratorio emplea un sistema de procesamiento de muestras automático, deben seguirse las recomendaciones y el proceso indicados por el fabricante del procesador. Hay que programar el sistema de procesamiento de portaobjetos con las diluciones de muestra, los volúmenes dispensados y los tiempos de incubación indicados a continuación.

## 1. RECONSTITUCIÓN DEL TAMPÓN (PBS)

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua destilada o desionizada. El tampón PBS se puede tapar y conservar a una temperatura de entre 2 y 25 °C durante cuatro semanas como máximo.

## 2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Detección: diluya las muestras de los pacientes a 1:20; para ello, añada 0,05 ml (50 µl) de suero a 0,95 ml (950 µl) de PBS reconstituido.

Valoración semicuantitativa: realizar diluciones en serie de las muestras de cribado y del control valorativo (por ejemplo, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) mediante PBS.

## 3. PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS DE SUSTRATO

(30-40 µl/pocillo) Retire los portaobjetos de la bolsa y coloque los sueros de control en los pocillos de control de la siguiente manera: Coloque el frasco cuentagotas boca abajo y apriete despacio hasta que vea una gota en la punta. Pose la gota con cuidado en el pocillo de control adecuado; la punta del cuentagotas no debe tocar la superficie del portaobjetos. Añada 1 gota (30-40 µl) de muestra de paciente a los pocillos numerados.

**NOTA:** Cuando se lleve a cabo una detección general, se recomienda el control positivo antimitochondrial. Para realizar una valoración semicuantitativa, deberá seleccionar el control titulable con número de catálogo 12261-02, 12262-02, o 12263-02 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.

**ATENCIÓN:** SI LA PUNTA DEL CUENTAGOTAS TOCA LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS, EL SUSTRATO ANTIGÉNICO PUEDE SUFRIR DAÑOS.

## 4. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24 °C)

Coloque el portaobjetos en una cámara cubierta de humedad (una placa de Petri cubierta con un papel absorbente humedecido sería suficiente). Se debe incubar con la tapa puesta durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24 °C).

## 5. ENJUAGUE EN PBS

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuague brevemente con PBS usando un frasco rociador, una pipeta Pasteur o una pipeta serológica. No rocíe el tampón directamente en los pocillos.

**NOTA:** Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos, dirija el PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia la fila superior de pocillos y, a continuación, hacia la fila inferior de pocillos.

## 6. LAVADO EN PBS (10 minutos)

Lave los portaobjetos 10 minutos con PBS en una cubeta de tinción o cubeta Coplin. El lavado se puede extender de 10 a 30 minutos sin que los resultados del test final varíen. Deseche la solución de lavado de PBS después de utilizarla.

## 7. REACTIVO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES (cubra los pocillos con unas 12 o 14 gotas)

Retire uno a uno los portaobjetos del PBS. Golpee el lateral del portaobjetos contra papel secante o absorbente para retirar el exceso de tampón. Vuelva a colocar inmediatamente el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos completamente con reactivo de anticuerpos fluorescentes; comience colocando una gota en cada pocillo. Repita este procedimiento para cada portaobjetos. El reactivo de anticuerpos

fluorescentes se ha evaluado para compensar los restos de tampón que queden en el portaobjetos tras su enjuague.

**NOTA:** Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento; si se secan, el sustrato puede sufrir daños.

**NO PERMITA QUE EL PORTAOBJETOS SE SEQUE NI QUE SE FIJE SIN REACTIVO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES DURANTE MÁS DE 15 SEGUNDOS.**

## 8. INCUBACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24 °C)

Coloque la tapa en la cámara de incubación y, si la cámara no es opaca, cubra con papel absorbente para evitar la exposición a la luz. Los portaobjetos se deben incubar durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24 °C).

## 9. ENJUAGUE EN PBS

Retire los portaobjetos de la bandeja incubadora y enjuague brevemente con PBS. No rocíe el tampón directamente en los pocillos.

## 10. LAVADO EN PBS (10 minutos)

Lave los portaobjetos 10 minutos con PBS en una cubeta de tinción o cubeta Coplin. El lavado se puede extender de 10 a 30 minutos sin que los resultados del test final varíen cuando no se utiliza tinción de contraste.

## 11. MONTAJE DEL CUBREOBJETOS

Retire uno a uno los portaobjetos del PBS. Golpee el lateral del portaobjetos contra papel secante o absorbente para retirar el exceso de tampón.

**SIN UN CUBREOBJETOS DURANTE MÁS DE 15 SEGUNDOS.**

Añada 4 o 5 gotas de medio de montaje semipermanente en la línea media de cada portaobjetos. Coloque con cuidado el cubreobjetos en su posición. Evite que se formen bolsas de aire; para ello, baje despacio el cubreobjetos de un extremo del portaobjetos al otro.

**NOTA:** Un exceso de medio de montaje en el portaobjetos puede provocar un fondo de alta fluorescencia, debido a la dispersión de la luz o a una resolución no clara de las células (imagen borrosa). Debe eliminarse el exceso de medio de montaje del portaobjetos; para ello, seque el cubreobjetos con papel secante o papel óptico y evite mover directamente el cubreobjetos.

## 12. LEER DIAPOSITIVA

Si la diapositiva debe leerse mediante microscopía fluorescente convencional, puede leerse inmediatamente, mediante el procedimiento estándar del laboratorio. Las diapositivas siempre las debe leer un usuario capacitado que esté familiarizado con la interpretación y los patrones de las secciones de tejido fluorescente. Consulte con el proveedor del microscopio fluorescente 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® captura imágenes digitales de cada recipiente y presenta una vista panorámica de la sección de tejidos para que el usuario capacitado la revise. El Image Navigator® debe ser operado únicamente por un usuario capacitado.

## ASISTENCIA TÉCNICA:

EE. UU.: (+1) 800 251 5115 Fuera de EE. UU.: 1-916-363-2649  
Correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

