



SISTEMA DE ANALISIS FLUORESCENTE DE AUTOANTICUERPOS DE ANTI-ENDOMISIO (EmA) HISTOFLUOR®

Para uso diagnóstico in vitro

Solo para uso de exportación

Para uso profesional

USO PREVISTO: este test se basa en la técnica de anticuerpos fluorescentes indirecta y se emplea para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos antiendomiso en suero humano. El test está diseñado para su uso en la detección de anticuerpos asociados a la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme.

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).

PRINCIPIOS DEL TEST

El test de anticuerpos fluorescentes de Immuno Concepts emplea la técnica de anticuerpos fluorescentes indirecta descrita por primera vez por Weller y Coons (2). Las muestras de los pacientes se incuban con sustrato antigénico, para permitir la unión específica de los anticuerpos 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 incubaba 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 y los cubreobjetos se pueden guardar a temperatura ambiente (18 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]: N.º de catálogo 12004-01, 12008-01. Cortes finos (de entre 4 y 5 micrómetros aproximadamente) de tercio distal de esófago de primate.

Control específico positivo de anticuerpos antiendomisio [CONTROL] +: N.º de catálogo 12021-01. Frasco cuentagotas listo para su uso que contiene 1,0 ml de suero de control positivo humano con anticuerpos específicos para antígenos endomisiales. Este suero presenta un patrón de tinción antiendomisio positivo en el sustrato de tejido de primate.

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 12009-01 (9,0 ml), 12075-01 (23 ml). IgA 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.

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. Este reactivo se puede guardar a temperatura ambiente (18 a 25 °C).

Cubreobjetos [CVSLP]: N.º de catálogo 1042. Cada paquete contiene 10 cubreobjetos de cristal n.º 1 de 24x64 mm. Los cubreobjetos se pueden guardar a temperatura ambiente (18 a 25 °C).

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. Todos los materiales de origen animal utilizados en este producto proceden de instalaciones autorizadas por EE. UU. o el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).
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 DE MUESTRAS

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 un patrón no apreciable de tinción fluorescente verde claro, de baja intensidad y no específico en el tejido. 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.

Es importante no confundir la intensidad de la fluorescencia con la presencia o ausencia de anticuerpos. El factor clave a la hora de determinar si una dilución de suero es positiva es la presencia de un patrón claramente apreciable, independientemente de la intensidad de la tinción fluorescente.

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 la tinción es menor o igual a la del pocillo de control negativo y 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.

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Para realizar una determinación semicuantitativa, se pueden seguir las directrices para reactivos de anticuerpos fluorescentes definidas por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC por las siglas del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) de Atlanta (Georgia, EE. UU.).

- 4+ Verde-amarillento brillante (fluorescencia máxima): perfil bien delimitado.
- 3+ Fluorescencia verde-amarillenta menos brillante: perfil bien delimitado.
- 2+ Patrón definido pero con fluorescencia débil.
- 1+ Fluorescencia muy apagada.

Immuno Concepts, N.A. Ltd. ofrece un portaobjetos estándar para determinar estas intensidades de fluorescencia: el FITC QC Slide™, n.º de catálogo 1900.

INFORMES SOBRE LOS RESULTADOS

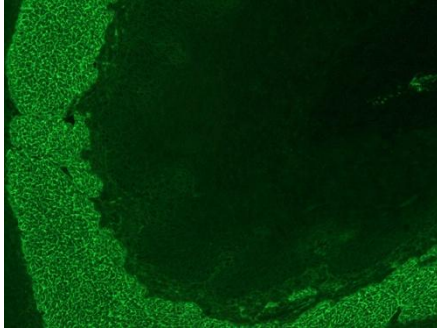
Detección: se debe indicar el patrón de tinción y si los resultados son positivos o negativos en la dilución 1:5.

DETECCIÓN DEL PATRÓN

Anticuerpos antiendomiso (EMA): se aprecia una fina red de fibras alrededor de las células musculares lisas en la capa muscular de la mucosa.

Antígeno: transglutaminasa tisular en el endomiso que envuelve las células musculares lisas.

Asociación con enfermedades: se ha detectado la presencia de anticuerpos endomisiales en el 95 a 100 % de los pacientes con enfermedad celíaca no tratada.

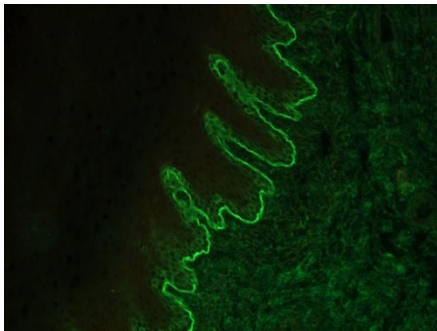


Anticuerpos antiendomisio

Anticuerpos antimembrana basal: destacada tinción de la región de la membrana basal a lo largo de la unión dermoepidérmica.

Antígeno: el antígeno se ha identificado como proteína transmembrana de 180 kDa (BP 180).

Asociación con enfermedades: estos anticuerpos se han asociado al pénfigo vesicular o ampolloso y se han detectado, aproximadamente, en el 70 % de los pacientes con esta enfermedad.

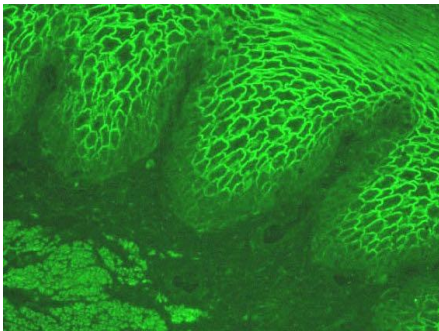


Anticuerpos antimembrana basal

Anticuerpo de unión intracelular: tinción del material intracelular del epitelio estratificado del esófago.

Antígeno: el antígeno se ha identificado como proteína desmogleína 3 de 130 kDa.

Asociación con enfermedades: estos anticuerpos se han asociado a la forma activa del pénfigo vulgar y se han detectado, aproximadamente, en el 90 % de los pacientes con esta enfermedad.



Anticuerpo de unión intracelular

LIMITACIONES DEL TEST

1. No se puede realizar ningún diagnóstico basado únicamente en la detección de anticuerpos en tejidos. 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, 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 suelen 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.

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)



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

Cat 12000-01-I,

4.11.02.003.142-Es

Rev 1.2

© Copyright 2019

PROCEDIMIENTO PARA ANALISIS FLUORESENTE DE AUTOANTICUERPOS DE ANTIENDOMISIO (EMA) 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 taponar y conservar a una temperatura de entre 2 y 10 °C durante cuatro semanas como máximo.

2. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Detección: diluya las muestras de los pacientes a 1:5; para ello, añada 0,100 ml (100 µl) de suero a 0,400 ml (400 µl) de PBS reconstituido.

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 antiendomiso. Si va a realizar una valoración semicuantitativa, seleccione el control positivo que presente el patrón de fluorescencia más parecido al patrón de fluorescencia de la muestra de detección (p. ej., para la muestra de paciente que revele en la detección un patrón de fluorescencia antiendomiso, emplee el control positivo antiendomiso).

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, inclinando 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. **NO PERMITA QUE EL PORTAOBJETOS SE SEQUE NI QUE SE FIJE SIN UN CUBREOBJETOS DURANTE MÁS DE 15 SEGUNDOS.** Añada suficiente medio de montaje semipermanente para cubrir los pocillos 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.

ASISTENCIA TÉCNICA:

EE. UU.: (+1) 800 251 5115 Fuera de EE. UU.: 1-916-363-2649

Correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

