

NOVA Lite® Rat Liver, Kidney, Stomach

704170

Per uso diagnostico *In Vitro*

Codice Prodotto: 704170, 704180
504170.10, 504180.25

Complessità CLIA: elevata

Finalità d'uso

El presente producto se utiliza para el screening y la titulación de los autoanticuerpos circulantes en el suero humano como auxiliar en el diagnóstico de las diferentes enfermedades autoinmunes. Los cuatro autoanticuerpos principales detectados son: anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimitocondriales (AMA), anticuerpos anti-musculatura lisa (ASMA) y anticuerpos anti-células parietales gástricas (AGPCA).

Sumario y Explicación de la prueba

La inmunofluorescencia indirecta es el método de referencia para el screening y la titulación de los autoanticuerpos circulantes en el suero. En general se prefieren las secciones de tejido animal, por ejemplo de ratón, a otros substratos utilizados habitualmente, tal como los preparados de células y las secciones de tejido humano; esto se debe principalmente a la ausencia de interferencias de HLA y/u otros anticuerpos dirigidos contra los grupos sanguíneos. La utilización de los tres tejidos diferentes (hígado, riñón y estómago) permite identificar los autoanticuerpos más fácilmente comparando los resultados obtenidos con cada tejido.

Algunos autoanticuerpos se asocian con un número diferente de enfermedades. Los ANA generalmente se encuentran en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) pero también en sueros de pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo y reumáticas. Los AMA se localizan generalmente en pacientes con cirrosis biliar primaria, pero también pueden encontrarse en pacientes con otras enfermedades hepáticas. Frecuentemente, los ASMA se asocian a hepatitis crónica activa y a cirrosis biliar primaria, siendo también detectados en concentraciones bajas con otras enfermedades. Los AGPCA aparecen en el suero de pacientes con anemia perniciosa. En la sección de los resultados se describe más detalladamente qué autoanticuerpos se asocian con qué enfermedad.¹⁻⁹

Procedimiento de trabajo

El test se basa en la inmunofluorescencia indirecta. Tanto las muestras como los controles correspondientes se incuban en los portaobjetos con substrato. Mediante lavado se eliminan los anticuerpos que no han reaccionado y después se aplica el conjugado de fluorescencia apropiado.¹⁰ El conjugado no ligado se elimina mediante lavado. Los portas se examinan en un microscopio de fluorescencia. Las muestras positivas producen una fluorescencia de color verde que corresponde a las áreas de la sección en las que se ha unido el autoanticuerpo.

Reactivos

1. Portas con secciones de hígado, riñón, estómago de rata de 5 ó 10 pocillos, con desecante.

Sólo kits

2. Suero de control positivo ANA Homogéneo Patrón, conteniendo el 0,09% de azida sódica. **Prediluido y listo para el empleo.**
3. Control Negativo del sistema IFA conteniendo el 0,09% de azida sódica. **Prediluido y listo para el empleo.**
4. Antisuero de oveja anti-IgG humanas purificado por afinidad (H+L) conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) conteniendo el 0,09% de azida sódica. **Prediluido y listo para el empleo.**
5. Suero de control positivo Mitocondrial (AMA) Patrón, conteniendo el 0,09% de azida sódica. **Prediluido y listo para el empleo.**
6. Suero de control positivo Musculatura Lisa (ASMA) Patrón, conteniendo el 0,09% de azida sódica. **Prediluido y listo para el empleo.**
7. Azul de Evans al 1% coloración de contraste opcional
8. Tampón (PBS), en forma líquida concentrado 40 veces
9. Secantes, para secar los portas después del lavado
10. Solución de montaje, conteniendo un agente anti-fading (DABCO) 1, 4 diazabicyclo [2.2.2] octano
11. Cubreobjetos

Advertencias/ Precauciones

Todos los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. Deben establecerse métodos de manipulación y eliminación adecuados para todos los materiales potencialmente infecciosos y los procedimientos deben permitirse sólo a personal experto y autorizado.

El Azul de Evans y los controles del kit contienen el 0,09% de azida sódica como conservante y deben manipularse con precaución – no trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas. En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida. El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado.

Condiciones de almacenamiento

Los kits y los portaobjetos no abiertos deben conservarse a 2-8°C y se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada. ¡NO CONGELAR! Tras la extracción de los portas de su bolsa deberán utilizarse inmediatamente. El tampón PBS diluido puede conservarse durante un mes a 2-8°C. El conjugado FITC debe conservarse, en la medida de lo posible, al resguardo de la luz solar, fluorescente o ultravioletada. Todos los reactivos deben conservarse a 2-8°C.

Recolección de Muestras

Las muestras de suero deben proceder de extracciones venosas y dejarse coagular de forma natural. Separar rápidamente el suero con el fin de evitar hemólisis. El suero puede conservarse a 2-8°C durante un máximo de 7 días antes del ensayo¹¹, o para periodos más largos, distribuir el suero en alícuotas y conservarlo a -20°C, o temperatura inferior. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones. No utilizar muestras de suero contaminado microbiológicamente o con partículas, ni tampoco sueros hemolíticos o lipémicos ya que puede darse un título inferior o patrones de fluorescencia poco claros.

Procedimiento

Materiales Suministrados (kits)

704170

- 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (10 portas con secciones de hígado, riñón y estómago de rata, 5 pocillos)
- 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Homogéneo Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Sistema IFA Control negativo, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Patrón* (Mitochondrial (AMA) Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Musculatura Lisa (ASMA) Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 7mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (Conjugado IgG (H+L) FITC purificado por afinidad)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Azul de Evans al 1%)
- 2 x 25mL *PBS Buffer* (PBS concentrado 40 veces)
- 1 x 3mL *Mounting Medium* (Solución de montaje)
- 20 x *Blotters* (Secantes)
- 10 x *Coverslips* (Cubreobjetos)
- 1 x *Instruction Leaflet* (1 instrucciones de empleo)

704180

- 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (25 portas con secciones de hígado, riñón y estómago de rata, 10 pocillos)
- 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Homogéneo Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Sistema IFA Control negativo, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Patrón* (Mitochondrial (AMA) Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Musculatura Lisa (ASMA) Patrón, prediluido. Listo para usar)
- 1 x 15mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (Conjugado IgG (H+L) FITC purificado por afinidad)
- 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Azul de Evans al 1%)
- 2 x 25mL *PBS Buffer* (PBS concentrado 40 veces)
- 1 x 10mL *Mounting Medium* (Solución de montaje)
- 50 x *Blotters* (Secantes)
- 25 x *Coverslips* (Cubreobjetos)
- 1 x *Instruction Leaflet* (1 instrucciones de empleo)

Material suministrado (portaobjetos)

- 504170.10** - 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (10 portas con secciones de hígado, riñón y estómago de rata, 5 pocillos)
O
- 504180.25** - 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (25 portas con secciones de hígado, riñón y estómago de rata, 10 pocillos)
- 1 instrucciones de empleo

Material necesario no incluido

Agua destilada para diluir el PBS concentrado.

Recipientes para el PBS.

Micropipetas y puntas desechables para dispensar las muestras de los pacientes.

Cámara húmeda para los pasos de incubación

Microscopio de fluorescencia con un filtro a 495nm (exciter) y un filtro a 515nm (barrier).

Botella comprimible de plástico para el lavado inicial con PBS.

En caso de utilizar solo portas con substrato, pueden adquirirse de INOVA Diagnostics los siguientes componentes adicionales: PBS (508002) Control negativo IFA Sistema (508186), ANA Homogéneo Patrón (504054), Mitochondrial (AMA) Patrón (504052), Musculatura lisa (ASMA) Patrón (504053), Conjugado IgG (H+L) FITC (504021, 504072), solución de montaje (504046, 504047), Azul de Evans al 1% (504049).

Procedimiento del test

Control de calidad

Control de calidad. Deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se ensayen las muestras.

- Solución de montaje.** Antes de su empleo, sacar la solución de montaje del refrigerador y dejar que llegue a temperatura ambiente (18-28°C).
- PBS concentrado.** Diluir el PBS concentrado con agua destilada (1 parte PBS + 39 partes de agua destilada) y mezclar. El PBS se emplea para la dilución de las muestras de los pacientes y como tampón de lavado.

3. **Dilución de muestras de los pacientes.**
Screening: Diluir las muestras de los pacientes 1:20 (añadiendo 50µL de suero a 950µL de tampón PBS).
Titulación: Realizar diluciones en serie de las muestras positivas con PBS (p.ej. 1/20 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 etc.). Ejemplo: Mezclar 100µL de la dilución 1:20 con 100µL de PBS para obtener una dilución de 1/40. Repetir el procedimiento para otras diluciones.
4. **Portas con substrato.** Dejar que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente (18-28°C) antes de sacarlos de la bolsa. Etiquete los portaobjetos correctamente, colóquelos en la cámara húmeda y añada el control positivo y negativo en los respectivos pocillos. Añada 50µL de las muestras diluidas en los pocillos restantes.
5. **Incubación de los portas.** Incubar los portas durante 20 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28°C).
6. **Lavado con PBS.** Saque los portaobjetos de la cámara húmeda y aclárelos brevemente con el PBS en una botella comprimible de plástico. No dirija directamente el chorro a los pocillos. Coloque los portaobjetos en un rack, sumérjeles en el PBS, después agite durante 5-10 minutos.
7. **Añadición de conjugado de fluorescencia.** Eliminar el exceso de PBS y secar alrededor de los pocillos. Colocar los portas de nuevo en la cámara húmeda e **inmediatamente** aplicar en cada pocillo una gota de conjugado fluorescente. **NO DEJAR LOS POCILLOS DESTAPADOS MÁS DE 15 SEGUNDOS.** El secado del substrato afecta negativamente los resultados.
8. **Incubación de los portas.** Incubar los portas durante 20 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28°C) y a oscuras.
9. **Lavado con PBS.** Lavar otra vez tal y como se describe en el paso 6 Contra-coloración opcional: añadir 2-3 gotas de Azul de Evans al 1% por 100mL de PBS antes de proceder a la inmersión de los portas.
10. **Montaje del cubreobjetos.** Sacar uno por uno los portas del PBS. Secar rápidamente alrededor de los pocillos y añadir una gota de solución de montaje a cada pocillo. Cubrir con cuidado el porta con el cubreobjetos evitando la formación de burbujas. ¡En caso de formarse burbujas, no intente quitarlas!
11. **Examen de los portas con el microscopio de fluorescencia.** Los portaobjetos pueden conservarse a 2-8°C a oscuras durante un máximo de 3 días, sin una significativa pérdida de fluorescencia.

Resultados

Control de calidad

El ANA Homogéneo Patrón debe dar una fluorescencia verde brillante con patrones homogéneos en los núcleos celulares. El Mitocondrial (AMA) Patrón debe dar un color verde brillante en los túbulos renales y en las células parietales gástricas. El de Musculatura Lisa (ASMA) Patrón debe dar una fluorescencia verde brillante en la capa muscular del estómago. El control negativo debe dar una coloración débil en todos los tejidos sin apreciarse una fluorescencia. En caso de que los controles no concuerden con lo antes descrito, el test no es válido y deberá repetirse.

Interpretación de los resultados

Resultado negativo

Se observa una coloración verde oscura en todas las secciones, sin fluorescencia visible. Reacciones débiles sospechas deben repetirse pero aumentando el factor de dilución (por ejemplo 1/40). Si, tras la repetición del ensayo, el resultado es igual al inicial, el ensayo se considera negativo.

Resultado positivo

Se observa una fluorescencia significativa en las áreas tisulares específicas que presentan uno o más de los siguientes patrones:

Anticuerpos antinucleares (ANA)

Los ANA coloran los núcleos de las siguientes células: células hepáticas, túbulos renales distales y proximales, células principales y parietales gástricas. Casi todos los pacientes con SLE presentan ANA en el suero, pero los ANA pueden también estar presentes en varias enfermedades del tejido conjuntivo, incluyendo la artritis reumatoide. Además los ANA se pueden observar en la hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primitiva, así como en respuesta a determinados tratamientos farmacológicos.

Pueden obtenerse informaciones adicionales mediante la interpretación de los patrones nucleares de los ANA observados en los ensayos (véase a continuación). Se recomienda titular todas las muestras ANA positivas hasta el punto final para garantizar la detección de eventuales reacciones mixtas que de lo contrario podrían no revelarse. También se recomienda efectuar otro análisis de dichas muestras para determinar los autoanticuerpos ante el DNA bicatenario y los antígenos nucleares extraíbles (ENA).

Patrón	Antígeno implicado	Enfermedad asociada
Homogéneo	ds DNA, histonas	SLE Artritis reumatoide (RA) Enfermedad del tejido conjuntivo mixto Lupus inducido por fármacos
Periférico (Borde)	Nativo/ds DNA	SLE
Granular	Antígeno nucleolares extraíbles Ribonucleoproteínas Scl-70 SSB	Esclerodermia Síndrome de Sjögren Enfermedad del tejido conjuntivo mixto SLE
Nucleolar	4-6S sRNA	Esclerodermia Síndrome de Sjögren SLE, RA y esclerosis sistémica progresiva

Patrones de fluorescencia de autoanticuerpos específicos del tejido:

Anticuerpo	Tejido asociado	Patologías asociadas
Anticuerpos antimitocondriales (AMA)	Citoplasma de los túbulos renales distales y túbulos proximales (en medida menor) Citoplasma de las células hepáticas (hígado) y citoplasma de las células parietales gástricas (estómago)	Cirrosis biliar primaria y otras enfermedades hepáticas
Anticuerpos anti-músculo liso (ASMA)	Capas musculares (estómago) Capas musculares arteriolas (otros tejidos)	Hepatitis crónica activa
Anticuerpos anti-células gástricas parietales (AGPCA)	Células parietales (estómago)	Anemia perniciosa
Anticuerpos antireticulina (ARA)	Fibras peritubulares y cápsulas de Bowman (riñón) Membranas celulares hepáticas, paredes sinusoidales (hígado)	Enfermedad de Crohn Enfermedad celíaca Dermatitis herpetiforme

NOTA: Cada laboratorio deberá establecer el punto en el que se considera que un resultado positivo es clínicamente significativo.

Limitaciones del Procedimiento

- Este ensayo por sí solo no es válido para el diagnóstico. También deben tenerse en cuenta los demás factores, incluidos la historia clínica de los pacientes y otros resultados serológicos o biopsicos.
- Los patrones de fluorescencia a menudo cambian cuando la muestra es titulada hasta punto final. Este cambio generalmente es debido a la presencia de más de un autoanticuerpo, especialmente para los ANA.
- Un resultado negativo puede indicar la remisión de la enfermedad o la presencia de autoanticuerpos no detectables con esta técnica.
- La fuente de luz, los filtros y la óptica de los microscopios de fluorescencia de diferentes marcas influirán en la sensibilidad del kit. El funcionamiento del microscopio depende en gran medida de un correcto mantenimiento, especialmente del enfoque y reemplazo de la lámpara de vapor de mercurio después del período de tiempo recomendado.
- Los autoanticuerpos pueden ser activados o inducidos por determinados fármacos como los antibióticos o los anticonceptivos orales.
- Debido a la reducida distancia entre pocillos de los portaobjetos de 10 pocillos, puede que se produzca contaminación cruzada de muestras y controles. Se recomienda por lo tanto, una manipulación cuidadosa, especialmente en los pasos de lavado.
- No se ha evaluado la idoneidad del uso con reactivos IFA de otros fabricantes, sin embargo, no debe excluirse su empleo.

Los portaobjetos comercializados por separado se clasifican como "reactivos específicos para los analitos". Salvo que se trate de componentes del kit, las características analíticas y de rendimiento no están establecidas.

Valores Previstos y Características de Rendimiento

Resultados esperados

Valores normales

Anticuerpo	Frecuencia en %	Referencia
ANA	0-2	2
AMA	0-8	7
ASMA	3	2
ARA	5	8
AGPCA	10-15 (en ancianos)	9

Valores anormales

	Diagnóstico	Frecuencia en %	Referencia
ANA	SLE	99	4
	Enfermedad del tejido conjuntivo mixto.	90	3
	Otras enfermedades autoinmunes (RA, esclerodermia, síndrome de Sjögren, dermatomiositis)	15-50	3, 5
AMA	Cirrosis biliar primaria	>95	3
ASMA	Hepatitis crónica	70	3
	Cirrosis biliar primaria	50	3
ARA	Enfermedad de Crohn	24	6
	Enfermedad celíaca	38-50	3, 6
	Dermatitis herpetiforme	22	6
AGPCA	Anemia perniciosa	90	9

Estudio comparativo

Se realizó un estudio comparativo con 96 muestras clínicas utilizando este kit y con un método de referencia comercialmente disponible. 93 de las 96 muestras analizadas dieron resultados idénticos con ambos métodos. Para los patrones descritos en el punto resultado, la sensibilidad osciló entre 89 y 100%, la especificidad relativa fue del 100% en cada caso y la concordancia relativa osciló entre 93 y 100%. Para las muestras que difirieron, se obtuvo una coloración positiva débil ANA o SMA sólo con el método de referencia, lo que sugiere que estas muestras estuvieron en el límite en el patrón específico y/o que existen ligeras diferencias de sensibilidad entre los dos métodos.

Resumen del procedimiento

1. Dejar que la solución de montaje alcance la temperatura ambiente.
2. Diluir el tampón PBS con agua destilada.
3. Diluir los sueros de los pacientes 1/20 con PBS.
4. Dejar que los portas alcancen la temperatura ambiente (18-28°C).
5. Dispense 50µL de los controles positivos y negativos y sueros de pacientes diluidos en los respectivos pocillos.
6. Incubar en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 20 minutos.
7. Lave durante 5-10 minutos en PBS.
8. Seque el contorno de cada pocillo y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado.
9. Incube como en la fase 6 en lugar oscuro.
10. Lave como en la fase 7.
11. Monte.
12. Examine el portaobjetos con el microscopio de fluorescencia.

Referencias

1. Tan E M (1989). Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151.
2. Doniach, D, et al. (1986). Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin. Exp. Imm* **1**: 237-262.
3. Wallington, T B & Gooi H C (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford UK. 195-220.
4. Cavallaro, J J, et al (1976). Immunofluorescent detection of autoimmune diseases, Immunology Series No. 7. CDC, Atlanta, GA.
5. Seah, P P et al (1971). Antireticulin antibody: Tissue autoantibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet* **1**, 834-836.
6. Seah, P P et al (1973). Antireticulin antibody: Incidence and diagnostic significance. *Gut* **14**, 311-315.
7. Goudie, R B et al (1966). Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Path*, **19**, 527-538.
8. Rizzeto, M & Doniach, D (1973). Types of reticulin antibodies detected in human sera by immunofluorescence. *J. Clin. Path.* **26**, 841-851.
9. Bird, A G (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford, UK. Pg.175-194.
10. Weller, TH, Coons, AH (1954). Fluorescent antibody studies with agents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **86**, 789 – 794.
11. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Fabricante:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950
info@inovadx.com

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624170ESP

April 2010
Revision 0

