

## Método de ensayo de inmunofluorescencia general

### ETIQUETA DEL PRODUCTO

#### UTILIZACIÓN PREVISTA

Los componentes incluidos en la sección "Materiales" pueden ser utilizados para detectar anticuerpos en suero humano mediante inmunofluorescencia indirecta.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Estas instrucciones de uso proporcionan un protocolo general para utilizar muestras de sustrato y conjugados adecuados para estudios de inmunofluorescencia indirecta. Los autoanticuerpos pueden ser visualizados en variedad de secciones de tejido y sustratos de cultivos celulares utilizando un sistema de conjugado de isocianato de fluoresceína (FITC). Los puntos básicos del procedimiento se describen en la sección siguiente. Los laboratorios concretos pueden utilizar esta etiqueta de producto como guía pero deberían realizar evaluaciones internas de los protocolos de uso para estos materiales.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los componentes incluidos dentro de los "Materiales" pueden ser utilizados en protocolos de inmunofluorescencia indirecta. En ese tipo de protocolos, el suero del paciente es incubado en una muestra de sustrato para que los anticuerpos se unan. Cualquier anticuerpo que no quede unido es eliminado enjuagándolo. Los anticuerpos unidos de clase IgA, IgG y/o IgM, en función del conjugado utilizado, son detectados mediante la incubación del sustrato con conjugado antihumano con fluoresceína. Se observan las reacciones bajo un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados. La presencia de anticuerpos puede ser demostrada mediante una fluorescencia verde manzana de estructuras histológicas específicas en el sustrato. La titulación puede ser determinada por la dilución en serie del espécimen. El recíproco de la dilución más elevada que dé una reacción positiva es la titulación.<sup>1</sup>

#### INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

##### Almacenamiento y preparación

Guarde todos los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para ser utilizados después de equilibrarlos con la temperatura ambiente.

##### Materiales

Se proporcionan estas instrucciones para utilizarlas con los componentes individuales, incluyendo los códigos de producto incluidos a continuación. Las muestras de sustrato aparecen al lado del conjugado adecuado para detectar autoanticuerpos en ese sustrato concreto.

Muestra de sustrato		Conjugado		Control positivo		Dilución de espécimen	Tiempo de incubación de la muestra*
REF	Descripción	REF	Descripción	REF	Descripción		
2123	Muestra de glándula suprarrenal de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratención azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2279	Control positivo anticuerpos suprarrenales	1:4	30 minutos
2124	Muestra de glándula salivar de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratención azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2201	Control homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2125-4	Muestra de ovario de primate, 4 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratención azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2206	Control positivo anticuerpos células esteroideas	1:10	3 horas
2127	Primate diapositiva pituitaria, 6 así	2099 or 2100	IgG antihumano de cabra FITC con contratención azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2201	el control homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2128	Muestra de cerebelo de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratención azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2280	Control positivo anticuerpos anti-Hu	1:10	30 minutos

2134	Muestra de nervio ciático de primate, 6 pocillos	2140	IgM antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml	2209	Control positivo anticuerpos anti-MAG	1:10	30 minutos
2147	Muestra de piel de espesor parcial de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2213 y/o 2217	Control positivo anticuerpos intercelulares y/o control positivo anticuerpos anti-BMZ	1:10	30 minutos
2148	Rata de diapositivas de riñón / estómago , 8 así	2100	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2201, 2210	ANA ( homo ) Control Positivo , AMA control positivo	1:10	30 minutos
2155	Muestra de esófago de primate, 6 pocillos	2100 (o 2099 )	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2213 y/o 2217	Control positivo anticuerpos intercelulares y/o control positivo anticuerpos anti-BMZ	1:10	30 minutos
2156	Muestra de epitelio de transición, 6 pocillos	2100	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	2235	Control positivo anticuerpos Anti-PNP	1:10	30 minutos
2157	Muestra de corazón de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2235	Control positivo anticuerpos de músculo esquelético/corazón	1:10	30 minutos
2158	Muestra de músculo esquelético de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2235	Control positivo anticuerpos de músculo esquelético/corazón	1:10	30 minutos
2169	diapositiva del estómago de ratón, 6 bien	2100	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	2201	el control homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2172	diapositiva de músculo esquelético de rata, 6 bien	2100 (o 2099 )	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2201	el control homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2180	Muestra de tiroides de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2239	Control positivo de anticuerpos microsomaes/tiroides	1:10	30 minutos

\* En todos los casos, la segunda incubación (incubación con conjugado) dura 30 minutos.

### Componentes opcionales

<b>REF</b>	<b>Descripción</b>	<b>U/M</b>
2099	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC adsorbido primate con contratinción azul de Evans	5ml
2100	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2100x	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2100x-8	Conjugado IgG antihumano	8ml
2100-15	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2100-15x	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2107	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2107x	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2113	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2113x	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2113-15	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2130	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2130x	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2130-15	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC con contratinción azul	

ES

	de Evans	15ml
2130-15x	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2140	Conjugado IgM antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2140x	Conjugado IgM antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2200	Control negativo IFA	0,5ml
2201	Control positivo homogéneo ANA	0,5ml
2206	Control positivo células anti-esteroideas	0,5ml
2209	Control positivo anti-MAG	0,5ml
2210	Control positivo AMA	0,5ml
2210-1	Título bajo Control positivo AMA	0,5ml
2210-50	Control positivo AMA	50ml
2211	Control positivo ASMA	0,5ml
2213	Control positivo anti-IC	0,5ml
2213-1	Control titulación baja IC	0,5ml
2214	Control positivo anti-IC (pemphigus vulgaris)	0,5ml
2216	Control positivo anti-IC (pemphigus foliaceus)	0,5ml
2217	Control positivo anti-BMZ (pemphigoid)	0,5ml
2235	Control positivo anticuerpos anti-músculo esquelético/corazón	0,5ml
2239	Control positivo anticuerpos anti-microsomales/tiroideos	0,5ml
2243	Conjugado IgG FITC con Evans Blue	60ml
2261	Control positivo de P ribosomal	0,5ml
2279	Control positivo anti-suprarrenal	0,5ml
2280	Control positivo anti-Hu	0,5ml
2281	Control positivo anti-Yo	0,5ml
2301	PBS	para 1 litro
2302	Diluyente de muestra	60ml
2500	Lámina para cubrir muestras de microscopio (24x60mm)	caja de 12
2505	Vial cuentagotas mediano	5ml
2506	Vial cuentagotas mediano	60ml
2510*	Contratinción azul de Evans	1,0ml

### Símbolos utilizados en las etiquetas:



Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación



\*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

### Material necesario pero no suministrado

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipeta o pipeta Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta para tinción (por ejemplo, cubeta Coplin)

- Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, de 13 x 75 mm) y rejilla para tubos de ensayo
- Agua destilada o desionizada
- 1 recipiente de 1 litro
- Frasco de lavado
- Toallitas de papel
- Cámara de incubación

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para utilización diagnóstica *in vitro*. Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Todos los especímenes de suero humano y productos derivados de los seres humanos deberían ser tratados como potencialmente peligrosos, independientemente de su origen. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.<sup>2</sup>

ADVERTENCIA – La azida sódica (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar líquidos, enjuáguelos con grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión. En caso de ser ingerida, informe del incidente inmediatamente al director del laboratorio o al servicio de toxicología.

### RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especímenes entre 2°C y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más prolongados, el suero debería ser congelado a -20°C. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

### PROCEDIMIENTO

#### Método de análisis

#### A. Reconocimiento

1. Diluya cada muestra de suero del paciente con el Diluyente Tamponado siguiendo las cantidades de dilución recomendadas en la sección Materiales proporcionados. 1:4 (0,1 ml suero + 0,3 ml diluyente) o 1:10 (10 µl suero + 90 µl diluyente). No diluya los Controles Positivos o Negativos que va a utilizar. Guarde el suero no diluido para determinar las titulaciones de los anticuerpos si los análisis de reconocimiento dan positivo.
2. Deje que las bolsas con las muestras de sustrato se equilibren con la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Saque las muestras con cuidado sin tocar el sustrato.
3. Etiquete las muestras y colóquelas en una cámara de incubación recubierta de toallitas de papel humedecidas con agua para evitar que se sequen.
4. Invierta el vial cuentagotas y apriételo suavemente para aplicar 1 gota (O lo suficiente para asegurar la abertura también) del Control Negativo en el pocillo n.º 1. Si procede, aplique 1 gota de Control Positivo en el pocillo n.º 2. Evite llenar demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o una pipeta Pasteur, aplique 1 gota de suero diluido del paciente (O lo suficiente para asegurar la abertura también) en el resto de pocillos. Evite llenar demasiado los pocillos.
6. Tape la cámara de incubación e incube las muestras a temperatura ambiente en función del tiempo de incubación de muestras recomendado en la sección Materiales proporcionados.
7. Saque una muestra de la cámara de incubación. Sujete la muestra por un extremo y enjuáguela cuidadosamente con aproximadamente 10 ml de PBS utilizando una pipeta, o enjuague la pipeta en un vaso de precipitados lleno de PBS. No utilice el frasco de lavado. Pase la muestra inmediatamente a la cubeta Coplin y déjela en ella durante 10 minutos. Repita este proceso con las muestras siguientes.
8. Saque las muestras de la cubeta Coplin. Seque el extremo de la muestra con una toallita de papel para retirar el exceso de PBS. Meta la muestra en la cámara de incubación. Invierta inmediatamente el vial cuentagotas de Conjugado y apriételo suavemente para aplicar 1 gota en cada pocillo.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada una de las muestras.
10. Vuelva a tapar la cámara de incubación. Incube la muestra **30 minutos** a temperatura ambiente.
11. Saque la muestra de la incubadora. Sujete la muestra por un extremo y métala en un vaso de precipitados con PBS para retirar el exceso de conjugado. Coloque las muestras en una cubeta para tinción llena de PBS durante 10 minutos. Si utiliza conjugado opcional sin contratinción (consulte los componentes opcionales dentro de la sección Materiales proporcionados), puede añadir 2-3 gotas de contratinción azul de Evans en la inmersión final. Repita la operación para las muestras restantes.

NOTA: Si no sumerge las muestras adecuadamente podría existir un aumento de la fluorescencia de fondo.

12. Saque una muestra de la cubeta de tinción. Seque el extremo de la muestra con una toallita de papel para retirar el exceso de PBS. **Para que la muestra no se seque, proceda inmediatamente con el paso siguiente mientras esté todavía húmeda.**
13. Coloque la lámina para cubrir la muestra aplicando **3 gotas** de Medio de Montaje homogéneamente y coloque la lámina sobre la muestra. Evite presionar demasiado la lámina y moverla hacia los lados.
14. Repita los pasos **12 y 13** para cada una de las muestras.
15. Examine la fluorescencia específica bajo un microscopio de fluorescencia con una aumento de 200x o superior.

Las muestras pueden ser estudiadas nada más prepararlas. Sin embargo, gracias a la presencia de agente antidebilatamiento en el medio de montaje, no se perderá demasiada intensidad en la tinción si estudia la muestra hasta 48 horas más tarde. Las muestras deberían guardarse en un lugar oscuro a 2-8°C.

## B. Determinación final (titulación)

Un suero que ha dado positivo en el análisis de reconocimiento puede volver a ser analizado siguiendo los pasos 5 a 13 para determinar su titulación. Realice diluciones dobles en serie empezando con la dilución de reconocimiento inicial. El recíproco de la dilución más elevada que dé una reacción positiva es la titulación. A continuación se incluyen tablas para las diluciones de reconocimiento estándar:

### Preparación de diluciones en serie empezando por 1:4

Numere seis tubos del 1 al 6. Añada 0,3 ml de Diluyente de Muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Aplique 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mézclelo bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mézclelo bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo a otro después de mezclarlo para conseguir las diluciones que aparecen en la tabla siguiente:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0,3 ml		0,2 ml		0,2 ml	0,2 ml
	0,2 ml		0,2 ml			

### Preparación de diluciones en serie empezando por 1:10

Numere seis tubos del 1 al 6. Añada 0,9 ml de Diluyente de Muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Aplique 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mézclelo bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mézclelo bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo a otro después de mezclarlo para conseguir las diluciones que aparecen en la tabla siguiente:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transferencia		↗	↗	↗	↗	↗
		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

## CONTROL DE CALIDAD

Deberían incluirse un Control Positivo y un Control Negativo en cada análisis. El Control Negativo no debería mostrar una fluorescencia específica. El laboratorio debe determinar las características de rendimiento adecuadas del Control Positivo utilizado.

Si no se obtienen los resultados esperados, debería volver a realizarse el análisis. Si siguen obteniéndose resultados inadecuados con los controles, podría deberse a:

- Turbidez. Térela y utilice otro control.
- Problemas con el sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Por ejemplo, una alineación inadecuada, que la bombilla esté vieja y gastada, etc.
- Se ha dejado que la muestra se seque durante el procedimiento.

ES

### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia suelen ser negativos con una titulación inferior que la dilución de reconocimiento, positivos con una titulación superior o igual que la dilución de reconocimiento o, preferiblemente, positivos con una titulación final específica. Los laboratorios deben validar los protocolos de uso de estos materiales y formar a sus técnicos para buscar patrones de fluorescencia específicos adecuados para los materiales utilizados y los análisis realizados.

### **LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Los resultados de todos los análisis de inmunofluorescencia indirecta positivos así como los resultados de otros análisis de laboratorio y el estado clínico del paciente al realizar un diagnóstico.