

# MeDiCa

Kits para Inmunofluorescencia Indirecta Test de Anticuerpos (Series I)

IVD



Medical Diagnostics California  
336 Encinitas Blvd.,  
Suite 200  
Encinitas, CA 92024 USA  
http://www.medica-dx.com

Phone: (760) 634-5440 or  
(800) 845-6496 (USA only)  
Fax: (760) 634-5442  
E-mail: medica@medica-dx.com



CEpartner4U, 3951DB 13.NL  
Tel: +31 (0) 6-516.536.26

## Distribuido por:



### ***inmuno-mex, s.a. de c.v.***

Distribuidor de productos y equipos inmunológicos

Justo Sierra # 2821-A, Vallarta Norte  
Tels. De Larga Distancia sin Costo  
01 - 800 - 888 - 5859 y 01 - 800 - 888 - 1942  
Tel. - Fax (33) 3615 - 1942 c. Postal 44690  
Guadalajara, Jalisco, México  
E-mail: inmuno-mex@mexis.com  
www.inmuno-mex.com

## USO

Los kits para determinación de anticuerpos por Inmunofluorescencia de MeDiCa, se usan para la determinación cualitativa y semicuantitativa de clases específicas de autoanticuerpos IgG en suero humano, y como medio de diagnóstico de ciertas enfermedades.

### MeDiCa Series I kits\*

MeDiCa Kit	Catalogo #	Pocillos/ Porta	Anticuerpo Detectado	Substrato
AMA	3001	4 + 8	mitocondrial (M)	riñón de rata o ratón (k)
A-nDNA-A	2001	4 + 8	DNA nativo (nDNA)	<i>C. luciliae</i>
ASMA	4001	4 + 8	músculo liso (SM)	estómago (s) de rata o ratón
ATA	6001-TA + 6001-MI	4 + 8	tiroides (T)	tiroides de mono

## INTRODUCCION

El espectro de autoanticuerpos encontrado en humanos es muy amplio y dirigido a diferentes epitopos antigénicos. Los autoanticuerpos pueden ser divididos en dos grandes grupos. Como ejemplos de autoanticuerpos específicos de órganos o células se incluyen los anti-tiroideos o los anticuerpos anti islotes pancreáticos. Como ejemplos de autoanticuerpos no específicos de órgano se incluyen los anticuerpos anti nDNA o los anticuerpos anti-histona. Ha sido documentada la relación entre la presencia de autoanticuerpos y las enfermedades autoinmunes. El mecanismo patogénico de los autoanticuerpos, se ha establecido en 5 clases: lisis mediada por el complemento, fagocitosis o citotoxicidad, inmuno-complejos, interacción con el receptor e interacción con factores fisiológicos. La detección y cuantificación de los autoanticuerpos específicos permite el diagnóstico y monitorización de las enfermedades específicas autoinmunes (1).

## FUNDAMENTO DEL TEST

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es un método ampliamente usado para la detección de autoanticuerpos. La mayoría de los autoanticuerpos no muestran especificidad estricta, permitiendo que varios tejidos y células sean usados como sustratos para IFI. En general, los patrones de fluorescencia orientan sobre el tipo de antígeno y otros pasos de la investigación. Mientras que la metodología puede variar entre los laboratorios: microscopio, personal clínico y sustrato empleado, el protocolo estándar debe ser siempre respetado. MeDiCa fabrica sustratos que proporcionan resultados reproducibles y óptimos.

En las técnicas de IFI, el sustrato se recubre con suero del paciente y se incuba para permitir que los anticuerpos presentes se unan a sus antígenos. Los lugares donde los anticuerpos (inmunoglobulinas humanas), han reaccionado con los antígenos del sustrato son visibles con anti-anticuerpos humanos marcados con fluoresceína (conjugado) (1).

## COMPONENTES DE LOS KITS MEDICA

NOTA: Cada componente, incluyendo controles positivo y negativo, puede ser pedidos por separado.

### Reactivos

CONJUGADO – anti-inmunoglobulina humana, marcada con fluoresceína en tampón fosfato salino (PBS) y 1% de albúmina bovina (con o sin Azul de Evans). Listo para uso.

CONTROL POSITIVO\* – da un patrón de fluorescencia positivo. Listo para uso.

CONTROL NEGATIVO\* – no da señal de tinción fluorescente. Listo para uso.

SUBSTRATO – portas de pocillos múltiples de células o finas secciones de tejidos.

### Componentes no Reactivos

PBS – tampón fosfato salino (en polvo)

MEDIO DE MONTAJE – tampón con glicerol  
SECANTES\*

INSTRUCCIONES

\* Algunos de los kits MeDiCa no contienen controles o secantes.

### MATERIAL ADICIONAL NECESARIO POR TEST (no incluido en el kit)

Pipetas micrométricas: 10-15 µl

Tubos test y gradilla

Jarras Coplin de tinción o similar con soporte para los portas

Pinzas

Cámaras húmedas como Placas Petri con papel de filtro húmedo

Papel absorbente

Matraz de un litro o probeta graduada

Cubreobjetos de cristal 24 x 60 mm #1

Recipiente para el PBS

Agua destilada

Microscopio de Fluorescencia equipado para FITC (ver especificaciones del fabricante para cada instrumento)

## ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Las fechas de caducidad de los portas (tejido sustrato), conjugado y controles son para almacenamiento a -20°C o menos. Los portas de células Hep-2 se pueden mantener a 0-5°C. Una vez descongelados, el conjugado y los controles son estables durante 90 días si se mantienen de 2-8°C. Deben evitarse sucesivas congelaciones y descongelaciones. El medio de montaje es estable hasta la fecha de caducidad cuando se guarda en el refrigerador. El PBS en polvo puede mantenerse a temperatura ambiente hasta su fecha de caducidad.

## PRECAUCIONES

Todos los componentes de los kits de MeDiCa son SÓLO para diagnóstico *in vitro*. No usar pasada la fecha de caducidad. Controles, conjugado y medio de montaje contienen azida sódica como conservante a una concentración final de 1:1000. Este conservante es tóxico por ingestión, además puede reaccionar con tuberías de cobre o plomo formando azidas explosivas. Después de desechar la azida sódica contenida en las soluciones, aclarar con abundantes cantidades de agua. Todos los componentes de suero humano han sido testados por métodos aprobados por la FDA y encontrados negativos para anticuerpos VIH y VHC y no reactivos para el HBsAg. Sin embargo, ningún test puede asegurar la ausencia de estos antígenos. Manejar con precaución TODAS las muestras. No pipetear con la boca.

## TOMA DE MUESTRA

Recoger las muestras de sangre en tubos u otros sistema de recogida. Inmediatamente después de la formación del coágulo, separar el suero. El suero puede ser guardado en el refrigerador hasta 5 días. Para almacenamientos superiores congelar a -20°C. Turbidez, hemólisis, crecimiento bacteriano o drogas que puedan dar fluorescencia en el suero, pueden afectar negativamente el desarrollo del test. No usar sueros hemolizados o lipémicos.

## DESARROLLO DEL TEST

- PBS – Reconstituir disolviendo el contenido en un litro de agua destilada.
- MUESTRA SUERO – Diluir la muestra recién recogida, o almacenada adecuadamente 1:20 en PBS. Para titulaciones, doblar la dilución (ej. 1:40, 1:80, etc.).
- PORTAS – Manejarlos por los bordes. Una presión directa puede dañar el sustrato. Sacar los portas del congelador y dejar que alcancen la temperatura ambiente. Retirar los portas de su envuelta (rasgar o cortar con tijeras).
- CONTROLES – Controles positivo y negativo están listos para uso una vez que alcanzan la temperatura ambiente. El control positivo puede ser diluido 1+ como se sugiere en la Hoja de Información de Títulos (disponible bajo demanda).
- CONJUGADO – Listo para uso una vez que alcanza la temperatura ambiente.

PASO 1 – Poner suficiente cantidad de suero en cada pocillo con antígeno para cubrir el sustrato. Evitar tocar el sustrato con la pipeta. Identificar los pocillos con controles positivo y negativo y las diluciones del suero a testar. Se debe incluir un control positivo y negativo en cada día de análisis. No dejar que los pocillos se sequen porque podría dar falsos negativos. Incubar en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente.

PASO 2 – Retirar los portas de la cámara húmeda. Dar toques en los lados del porta sobre el papel absorbente para eliminar el exceso de muestra. Sumergir varias veces los portas en recipiente con PBS fresco, no usar botella lavadora. Inmediatamente poner los portas en un soporte o jarra Coplin y lavar dos veces

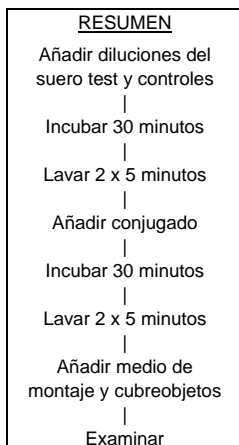
con PBS (5 minutos cada lavado). Se recomienda agitación suave. **Incubaciones superiores o lavados inadecuados pueden dar resultados con poca morfología del substrato y aumento de la fluorescencia de fondo.**

PASO 3 – Retirar los portas a la vez del PBS. Eliminar el exceso de PBS dando toques sobre papel secante y usar los secantes para secar los portas alrededor de los pocillos. Añadir inmediatamente el conjugado a cada pocillo para cubrir el substrato. No dejar que los pocillos sequen. Incubar 30 minutos.

PASO 4 – Repetir el lavado con PBS (Paso 2). Añadir 3-4 gotas de medio de montaje a cada porta y cubrir con un cubreobjetos #1. Presionar o mover lateralmente el cubre podría dañar el substrato. Examinar portas en 24 horas con microscopio de fluorescencia adecuadamente equipado para trabajar con FITC.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El punto final del TÍTULO es la mayor dilución que da un resultado positivo o una intensidad de tinción de la fluorescencia de 1+ (en una escala de 1+ para la intensidad más débil y 4+ para la más fuerte). Todos



los sueros positivos deberían ser diluidos hasta el título más alto usando diluciones dobles. Si en el suero del paciente hay más de un autoanticuerpo, podría haber interferencias. La titulación de esos sueros puede dar primero uno y luego el otro autoanticuerpo.

Título	Interpretación
< 1:20	Test negativo - normal, no hay autoanticuerpos activos
1:20 a 1:160	Test positivo – a menudo aparecen enfermedades autoinmunes
> 1:160	Test positivo – sugiere en gran medida una patología autoinmune activa

No hay asociación definitiva entre los patrones de fluorescencia y enfermedades específicas, pero se han citado ciertas correlaciones (ver tabla inferior).

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los kits Series I proporcionan una valiosa ayuda en el diagnóstico. Sin embargo, no deben ser considerados como único medio de diagnóstico. Resultados positivos del test pueden ser obtenidos con sueros de pacientes aparentemente sanos como resultado de muchos factores (27-29). Así, todos los resultados deben ser interpretados por una autoridad médica a la vista de las condiciones generales del paciente.

#### Asociaciones Específicas para Cada Anticuerpo Detectado

Ab	Ig Clase	Patrón de Tinción	Descripción de la Tinción	Anticuerpos Específicos	Principales Enfermedades Asociadas	Referencias
AEMA	IgA	Endomisial	Componentes reticulares de filamentos SM o endomisio brillantes	Transglutaminasa tisular (tTG)	Enfermedad celiaca, dermatitis herpetiforme	(2-4)
AMA	IgG	epitelial	Línea celular epitelial del túbulo renal brillante	Proteínas E2 y E3 del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC)	Cirrosis biliar primaria (PBC)	(5)
ANA	IgG o IgM	Difuso/homogéneo	Núcleos verde claro en interfase: masa cromosomal verde con bordes irregulares en verde brillante con núcleo en mitosis (Hep-2 sólo)	dsDNA, ssDNA, histonas	Lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus inducido por drogas, escleroderma, artritis reumatoide	(6-9)
		Nucleolar	Varios puntos verdes intranucleares; células en mitosis negativo	RNA polimerasa I, PM-Scl	Esclerosis sistémica (SSc), síndrome de Sjogren (SS), SLE, miositis inflamatoria	(9)
		Rim/periférico	Periferia del núcleo brillante: brillos alrededor del núcleo y masa cromosomal periférica con núcleo en mitosis	dsDNA, posiblemente histonas, componentes de la envoltorio del núcleo	SLE, PBC, síndrome anti-fosfolípidos, enfermedades del hígado y otras	(5,9-11)
		Moteado	Muchos y pequeños granos brillantes dispersos sin distinción de la línea externa del núcleo: negativo mitosis	Extractos nucleares Ags (ej. Sm, RNP, Scl-70, SS-A, SS-B)	Desorden del tejido conectivo mixto, SLE, SS, SSc, escleroderma	(9)
		Centrómerico (Hep-2 solo)	Granos de tamaño medio, brillantes con núcleo en interfase: granuloso, cromosomas en mitosis con forma de barra	Centrómero del cromosoma (kinetocore)	Síndrome CREST, enfermedad de Raynaud, PBC	(12,13)
A-nDNA-A	IgG	DNA nativo	Kinetoplasto y núcleo brillantes o sólo kinetoplasto	dsDNA	SLE	(14-16)
APCA	IgG o IgA	Células parietales	Células parietales brillantes con patrón lineal paralelo	Bomba de protones (H+/K+ATPase)	Anemia perniciosa, gastritis autoinmune, PBC	(17)
ASA	IgG	Sustancia intercelular	Células epiteliales escamosas de matriz intercelular brillante	Antígenos de la mucosa y piel intercelular	Pemphigus vulgaris	(18,19)
		Membrana basal	Membrana basal brillante	Antígenos de la membrana basal	Pénfigo globuloso	(18,19)
ASMA	IgG	Músculo liso	Fibras SM de la mucosa muscular brillantes	Actina	Hepatitis autoinmune (type 1), hepatitis viral aguda, mononucleosis infecciosa, asma bronquial intrínseco	(20-22)
ATA	IgG, IgA, IgM	Microsomal	Células citoplásmicas con epitelio escamoso brillante	Peroxidasa tiroidea	Enfermedad tiroidea autoinmune (AITD) (ej. Enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Grave)	(23-26)
		Tiroglobular	Lumen folicular brillante con patrón espiga irregular	Tiroglobulina/coloidal	Enfermedad tiroidea autoinmune (AITD) (ej. Enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Grave)	(23-25)

#### REFERENCIAS

- Verdier, F., Patriarca, C. and Descotes, J. (1997) *Toxicology*, **119**, 51-58.
- Dieterich, W., Storch, W.B. and Schuppan, D. (2000) *Clin Lab*, **46**, 361-364.
- Chorzelski, T.P., Beutner, E.H., Sulej, J., Tchorzewska, H., Jablonska, S., Kumar, V. and Kapuscinska, A. (1984) *Br J Dermatol*, **111**, 395-402.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O. and Schuppan, D. (1997) *Nat Med*, **3**, 797-801.
- Jones, D.E. (2000) *J Clin Pathol*, **53**, 813-821.
- Heffernan, M.P., Do, J.H. and Mehta, J. (2001) *Semin Cutan Med Surg*, **20**, 2-13.
- Evans, J. (1998) *Clin Chest Med*, **19**, 613-625, vii.
- Pahor, A., Krajnc, I., Gorenjak, M. and Holc, I. (1998) *Wien Klin Wochenschr*, **110**, 338-341.
- Wanchu, A. (2000) *J Postgrad Med*, **46**, 144-148.
- Nesher, G., Margalit, R. and Ashkenazi, Y.J. (2001) *Semin Arthritis Rheum*, **30**, 313-320.
- Hill, C., Roberts-Thomson, P., Pollard, A., Gillis, D. and Kirkham, B. (1996) *Aust N Z J Med*, **26**, 162-166.
- Chan, H.L., Lee, Y.S., Hong, H.S. and Kuo, T.T. (1994) *Clin Exp Dermatol*, **19**, 298-302.
- Powell, F.C., Winkelmann, R.K., Venencie-Lemarchand, F., Spurbeck, J.L. and Schroeter, A.L. (1984) *Mayo Clin Proc*, **59**, 700-706.
- Ballou, S.P. (1988) *In Vivo*, **2**, 19-24.
- Crowe, W. and Kushner, I. (1977) *Arthritis Rheum*, **20**, 811-814.
- Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Kotzin, B.L. and Schroeder, J., H. W. (eds.) (2001) *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 2nd ed. Mosby, London.
- De Aizpurua, H.J., Cosgrove, L.J., Ungar, B. and Toh, B.H. (1983) *N Engl J Med*, **309**, 625-629.
- Beutner, E.H., Jordon, R.E. and Chorzelski, T.P. (1968) *J Invest Dermatol*, **51**, 63-80.
- Jordon, R.E., Kawana, S. and Fritz, K.A. (1985) *J Invest Dermatol*, **85**, 72s-78s.
- Nakamura, R.M., Chisari, F.V. and Edgington, T.S. (1975) *Prog Clin Pathol*, **6**, 177-203.
- Dalekos, G.N., Zachou, K., Liaskos, C. and Gatselis, N. (2002) *Eur J Intern Med*, **13**, 293-303.
- Czajka, A.J. (1999) *J Hepatol*, **30**, 394-401.
- Beall, G.N. and Solomon, D.H. (1973) *Postgrad Med*, **54**, 181-189.
- Steffen, C. (1970) *Prog Clin Pathol*, **3**, 226-264.
- Whaley, K. and Buchanan, W.W. (1969) *Triangle*, **9**, 61-73.
- Czarnocka, B., Ruf, J., Ferrand, M., Carayon, P. and Lissitzky, S. (1985) *FEBS Lett*, **190**, 147-152.
- Tomer, Y. and Shoenfeld, Y. (1988) *Immunol Invest*, **17**, 389-424.
- Governa, M., Benedetti, E., Lorenzini, M. and Barisoni, D. (1987) *Burns Incl Therm Inj*, **13**, 469-475.
- Rosenberg, A.M., Bingham, M.C. and Fong, K.C. (1986) *Obstet Gynecol*, **68**, 560-562.