AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUAL DE INSTRUCCIONES

AESKUSLIDES® ANA HEp-2

Ref 51.1xx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

Manual de Instrucciones

ANA HEp-2

Ref. estándar	Descripción	Ensayos
51.100	**ANA HEp-2** (12 pocillos)	120
51.101	**ANA HEp-2** (12 pocillos)	120
51.100.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pocillos) Bulk Kit	600
51.101.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pocillos) Bulk Kit	600
51.180	**ANA HEp-2** (18 pocillos)	180
51.181	**ANA HEp-2** (18 pocillos)	180
51.180.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pocillos) Bulk Kit	900
51.181.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pocillos) Bulk Kit	900

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Índice de contenidos

1. USO PREVISTO 1
2. APLICACIÓN CLÍNICA 1
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO 2
4. INTERPRETATION 2
4.1 Patrón de membrana celular 2
4.2 Patrón del plasma nuclear (patrón nucleoplasmático) 3
4.3 Patrones nucleolares 5
4.4 Patrón del huso mitótico 5
4.5 Patrones citoplasmáticos 6
4.6 Negativo 7
4.7 No evaluable 8
4.8 Anexo 8
5. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO 9
a. Tabla 1: Intervalos de confianza para el conjunto de datos combinados 9
b. Tabla 2: Comparación de patrones entre kit de comparación y Aesku para conjunto de datos combinados 9
5.1 Reproducibilidad y precisión 9
6. HOJA DE INTERPRETACIÓN DE DATOS 10
7. CONTENIDO DEL KIT ESTÁNDAR 11
8. CONTENIDO DE REACTIVOS COMUNES 13
8.1 Reactivos comunes 13
8.2 Materiales necesarios no suministrados 14
9. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL 14
10. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 15
c. Riesgos para la salud 15
d. Instrucciones generales 15
11. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS 16
12. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO 16
e. Preparación 16
f. Procedimiento de la prueba 17
g. Flujo de trabajo 18
13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS 19
14. SÍMBOLOS REGLAMENTARIOS 20

ANA HEp-2

1. USO PREVISTO

***AESKUSLIDES*® ANA HEp-2** es un ensayo de inmunofluorescencia indirecta destinado a detectar autoanticuerpos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos en suero humano.

La prueba sirve para el diagnóstico diferencial de enfermedades reumáticas sistémicas, como el lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades mixtas del tejido conectivo (mixed connective tissue diseases, MCTD), esclerodermia, síndrome de Sjögren, polimiositis y dermatomiositis.

2. APLICACIÓN CLÍNICA

Los anticuerpos antinucleares (ANA) están dirigidos contra una variedad de antígenos nucleares y citoplasmáticos y aparecen con mayor frecuencia en las enfermedades reumáticas sistémicas. Por consiguiente, su determinación es una importante ayuda para el diagnóstico diferencial. Así, por ejemplo, los anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La) se asocian con el LES y el síndrome de Sjögren (SS), y los anticuerpos anti-dsADN y anti-Sm, contra las histonas y contra los nucleosomas se relacionan con el LES (Lupus eritematoso sistémico). Los anticuerpos anti-RNP se asocian con las enfermedades mixtas del tejido conectivo y el LES, los anticuerpos anti-Scl-70 con la esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva, ESP), los anticuerpos anti-Jo-1 con la polimiositis y la dermatomiositis, y los anticurpos contra la proteína del centrómero con el síndrome CREST. Para obtener información detallada, consulte la Sección 4 más adelante.

Hasta este momento, el método de elección para la detección de ANA ha sido la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFT) en células eucariontes, como las células HeLa y Hep2. Aunque la IFT es un método sensible, la realización de la prueba en un gran número de muestras es laboriosa. Además, el sistema de prueba puede estar sujeto a determinados errores debido a la interpretación de los resultados por el personal del laboratorio y a las diferencias entre los microscopios de fluorescencia. La especificidad de cada ANA puede determinarse a través de pruebas con ELISA específicos, que utilizan los correspondientes antígenos específicos. Esto permite una diferenciación sencilla y confiable de los ANA según su especificidad.

Antígeno: Células HEp-2

Reacciones cruzadas: No se conoce la existencia de reacciones cruzadas

La prueba se basa en el principio de inmunofluorescencia indirecta: los portaobjetos están cubiertos con cortes de tejidos o células (células HEp-2 para la determinación de ANA, granulocitos para la determinación de ANCA o *Crithidia luciliae* para la determinación de anticuerpos anti-ADNn). Si el suero del paciente contiene anticuerpos contra componentes de los tejidos o las células, se unirán al sustrato correspondiente sobre el portaobjetos durante la primera incubación. Los componentes del suero no unidos se eliminan mediante un paso de lavado. Los anticuerpos del paciente que quedan unidos se detectan en un segundo paso de incubación con un suero antiinmunoglobulina humana conjugado con fluoresceína, que se unirán a los anticuerpos del paciente y se hacen visibles a través de su colorante fluorescente. Como resultado, los complejos antígeno-anticuerpo presentan una fluorescencia específica de color verde, que puede visualizarse mediante un microscopio de fluorescencia.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Consulte el Procedimiento del ensayo indicado en el Manual común, Sección 12, para obtener instrucciones detalladas. Para los kits de ANA HEp-2, debe utilizarse la siguiente información:

- Tiempo de tinción de contraste: de 30 a 90 segundos
- Título de tamizaje recomendado:
  - 1:80 para muestras de adultos
  - 1:40 para muestras pediátricas.

4. INTERPRETATION

Las células **HEp2** son células epiteliales humanas cultivadas a partir del tejido de un carcinoma de laringe de un paciente. El sustrato presenta un desarrollo celular homogéneo sin conexiones celulares. Para la evaluación de muestras es de la mayor importancia disponer de células en mitosis, porque así pueden determinarse con precisión los patrones nucleares.

El título final correspondiente es la última dilución del suero del paciente que todavía produce una fluorescencia positiva.

La evaluación siempre debe hacerse con un control positivo y uno negativo. La fluorescencia débil de los núcleos celulares con títulos de 1:40 (niños) y 1:80 (adultos) o vaguedad respecto a los resultados clínicos debe ser verificada mediante los controles. En esos casos, deben obtenerse muestras del paciente aproximadamente cada 6 semanas y probarse de forma similar.[1]

4.1 Patrón de membrana celular

4.1.1 Tinción ligera de la membrana nuclear

Ligera fluorescencia homogénea en anillo de la membrana del núcleo celular en células en interfase. Algunas muestras con gran cantidad de anticuerpos dan la impresión de que todo el núcleo está teñido. Las muestras de este tipo deben observarse en células en telofase. En las células en metafase esta fluorescencia es difusa en el citoplasma y el material cromosómico no está teñido.

4.1.2 Patrón de tinción interrumpida de la membrana del núcleo celular

Es una fluorescencia discontinua, interrumpida, a lo largo de la membrana del núcleo de la célula. Enfocando a través del núcleo de las células se puede ver la tinción interrumpida sobre la superficie de todo el núcleo.

En la telofase se observa un patrón similar. En las células en metafase la fluorescencia se encuentra distribuida de forma difusa sobre todo el citoplasma. Algunas muestras con gran cantidad de anticuerpos dan la impresión de que todo el núcleo está teñido.

[1] Wiik A. Scand J Rheumatol 2005; 34:260-8.

4.2 Patrón del plasma nuclear (patrón nucleoplasmático)

4.2.1 Patrón de núcleo celular homogéneo

La fluorescencia uniforme difusa sobre todo el nucleoplasma, que a veces puede ser más intensa en la periferia del núcleo, puede relacionarse con diferentes anticuerpos, la mayoría de los cuales están dirigidos contra componentes de los cromosomas (ADN, histonas, etc.). En algunos casos se ve una intensa tinción en la zona interna del núcleo (ribete nuclear).

Algunas muestras pueden mostrar además una tinción de la periferia de los nucléolos. La tinción de los nucléolos es variable. En la metafase puede observarse una tinción homogénea o la tinción de la cromatina.

Pueden diferenciarse los siguientes patrones, levemente distintos:

- *Tinción nuclear homogénea con tinción homogénea de los nucléolos.*
- *Tinción nuclear homogénea sin tinción de los nucléolos.*

4.2.2 Tinción moteada del núcleo celular

Existe una serie de patrones moteados del núcleo celular, que son difíciles de diferenciar. Observando con el cuidado necesario, pueden diferenciarse siete patrones. En seis de estos patrones los cromosomas en metafase son negativos y muestran tinción positiva en el denominado patrón centromérico.

4.2.3 Patrón nuclear moteado grande (matriz nuclear) (SC35)

Motas de diverso tamaño dispersas en el nucleoplasma, antiguamente denominada tinción de la matriz nuclear. Se produce supuestamente por la tinción de los gránulos intercromatínicos. Los nucléolos son negativos. El citoplasma en metafase y telofase muestra un moteado de distribución difusa con cromatina negativa.

4.2.4 Patrón nuclear moteado grueso

Moteado densamente distribuido, de diferentes tamaños, habitualmente acompañado de un moteado grande distribuido sobre el nucleoplasma de las células en interfase. Los nucléolos son negativos. El citoplasma de las células en metafase y telofase muestra un moteado que se hace más denso alrededor de la cromatina, pero la cromatina misma es negativa. Este patrón se asocia principalmente con la tinción de los espliceosomas.

4.2.5 Moteado fino de los núcleos celulares

Una tinción moteada fina, de distribución regular, a veces muy densa, que hace que el patrón aparezca casi homogéneo. Los nucléolos pueden ser positivos (en especial en presencia de anticuerpos anti-SS-B/La), pero también pueden ser negativos. El citoplasma de las células en metafase muestra un moteado fino con acumulación alrededor de la cromatina, la que permanece negativa. Los nucléolos de las células en telofase pueden ser positivos; en ese caso a veces se tiñen con más intensidad que en las células en interfase.

4.2.6 Patrón granular semejante a Scl 70

Un moteado granular fino uniforme del nucleoplasma y de las zonas cromosómicas en células en metafase y telofase, a menudo con nucléolos fuertemente positivos. A bajo aumento, la tinción puede parecer homogénea. Este patrón no es exclusivo de los sueros positivos para anti-Scl 70.

4.2.7 Núcleos celulares moteados pleomórficos

Los núcleos de las células que se encuentran en proliferación (Fase S) muestran una variedad de diversos tipos de moteado del nucleoplasma, desde fino a extremadamente grueso e irregular (dependiendo del preparado celular, esto puede representar del 10 al 50 % de las células): En algunas células los nucléolos también están teñidos. Las células en fase de reposo (Fase G) y en metafase son negativas. Este patrón también se denomina patrón anti-PCNA (anti-proliferating cell nuclear antigen) y habitualmente se observa en asociación con otros patrones.

4.2.8 Patrón centrómero

Motas separadas bastante homogéneas que están distribuidas en todo el núcleo celular (40 a 60 motas por núcleo). Las células en telofase y metafase muestran siempre estas motas en el material cromósomico condensado. Este patrón es producido por anticuerpos dirigidos contra los cinetocoros de los cromosomas. Los anticuerpos pueden estar dirigidos contra varias proteínas del centrómero (CENP-A, B, C, D, E).

4.2.9 Puntos (dots) nucleares múltiples (NSp-1)

5 a 10 puntos (dots) por núcleo. En este caso se tiñen las subestructuras nucleares que a menudo se denominan corpúsculos PML (debido a su marcada frecuencia en la leucemia promielocítica [Pro Myelocyten Leukämie]). Los cromosomas de las células en metafase y telofase son negativos.

4.2.10 Puntos nucleares „coiled" (algunos puntos nucleares)

2 a 6 puntos por núcleo celular, localizados en el nucleoplasma. A menudo se encuentran en la vecindad inmediata de los nucléolos. No hay tinción de la cromatina en metafase ni en telofase.

4.3 Patrones nucleolares

4.3.1 Patrón nucleolar homogéneo

Fluorescencia de todo el nucléolo sin tinción de los cromosomas ni de la región organizadora del nucléolo (NOR) en células en división.

4.3.2 Patrón nucleolar grumoso

Gránulos claros aglomerados de gran tamaño, que pertenecen a componentes de los centros fibrilares de los nucléolos. En las células en mitosis, la placa de metafase y telofase parece tener una fluorescencia irregular en abanico.

4.3.3 Patrón nucleolar interrumpido

Pequeños gránulos separados, que se encuentran principalmente en el centro de los nucléolos. En las células en metafase pueden encontrarse de 2 a 5 motas bien definidas dentro del cuerpo cromatínico, que pertenecen a la región organizadora del nucléolo.

4.4 Patrón del huso mitótico

4.4.1 Patrón de centríolos (centrosomas)

En los husos de la metafase se observan puntos fluorescentes bien definidos en cada uno de los polos del huso, perpendiculares entre sí. En las células en interfase se distinguen uno o dos puntos claros en el citoplasma, cerca del núcleo celular.

4.4.2 Patrón de los polos del huso (NuMA)

Fluorescencia en la zona de los polos del huso en células en metafase (patrón triangular o con forma de banana). Las fibras del huso son negativas, con un patrón más lineal en las células en telofase. Principalmente en las células en reposo y telofase se observa un moteado fino con nucléolos negativos, pero estas células también pueden ser negativas.

4.4.3 Patrón de las fibras del huso

Tinción de todo el huso mitótico desde el polo hasta la placa cromatínica en las células en metafase. Ninguna tinción de los cromosomas de las células en reposo o en división.

4.4.4 Patrón del cuerpo medio (MSA-2)

En células en profase y metafase la fluorescencia se visualiza como finas líneas en la región cromosómica, perpendiculares a los flancos de la placa metafásica. En la telofase la fluorescencia está circunscripta al surco de división y a un pequeño cuerpo medio (Midbody) entre las células que terminan de dividirse. Las células en las fases S y G2 muestran un moteado discreto o irregular. Este patrón es producido por anticuerpos dirigidos contra el antígeno MSA-2 (Mitotic Spindle Antigen 2).

4.4.5 Patrón C-F

Las propiedades características se encuentran en las células en metafase, en las que el patrón está compuesto por dos grupos de grandes gránulos densos, que rodean la placa cromosómica de metafase como una garra; esto tiene a menudo el aspecto de una cremallera. Estos gránulos forman parte de los centrómeros. El citoplasma circundante se encuentra teñido de forma difusa. En las células en profase se visualiza una aglomeración densa interrumpida en los cromosomas. En algunas células en interfase puede verse un moteado nuclear denso, muy fino. Este patrón es producido por anticuerpos dirigidos contra el antígeno MSA-3 (Mitotic Spindle Antigen 3), que puede ser idéntico a la proteína F del centrómero (CENP-F).

4.5 Patrones citoplasmáticos

4.5.1 Moteado fino del citoplasma

Gránulos finos distribuidos por todo el citoplasma. A menudo se ven más claramente en la periferia de la célula y allí producen un aspecto de nebulosa estelar. No hay tinción de los núcleos celulares ni de los nucléolos. Este patrón es característico de los anticuerpos dirigidos contra la tRNA sintetasa. Los cromosomas de la metafase son negativos.

4.5.2 Patrón citoplasmático difuso

Fluorescencia muy fina, densa, granular u homogénea o un patrón nebuloso, que afecta parte del citoplasma. No hay tinción de los núcleos celulares, aunque los nucléolos pueden estar teñidos de forma homogénea, cuando los anticuerpos están dirigidos contra riboproteínas ribosomales, cuyos precursores se encuentran en los nucléolos. El material cromosómico de las células en metafase es negativo.

4.5.3 Patrón mitocondrial

Gránulos grandes irregulares, que se extienden en una formación reticular desde el núcleo celular hasta el citoplasma. El grupo antigénico M2, que es el principal reconocido, se compone de 4 proteínas mitocondriales de la membrana mitocondrial interna. Los núcleos celulares y los nucléolos son negativos; sin embargo, los sueros con altos títulos de anticuerpos pueden dar la impresión de que hay un moteado nuclear.

4.5.4 Patrón lisosómico

Fluorescencia irregular entre las organelas grandes, distribuida en todo el citoplasma. Este patrón puede ser producido por anticuerpos dirigidos contra organelas pequeñas, como lisosomas o peroxisomas. El núcleo celular no se tiñe, pero hay una tinción difusa del citoplasma de células en división.

4.5.5 Patrón del Golgi

Tinción de las organelas polares en la vecindad del núcleo, grandes gránulos irregulares. Los núcleos y los nucléolos son negativos. Tinción difusa del citoplasma de las células en división, más intensa en la zona del material cromosómico.

4.5.6 Patrón de actina

Tinción de las fibras de tensión celular que se encuentran en un solo plano focal, directamente bajo la membrana plasmática. Los núcleos, los nucléolos y los cromosomas de la metafase son negativos. Las cuerdas de actina cercanas a la membrana plasmática se extienden a todo lo largo de la célula. También pueden observarse ramificaciones dendríticas sobre la membrana celular.

4.5.7 Patrón de vimentina

Una gran cantidad de finas fibras que se expanden por todo el citoplasma muestran con la tinción una red radiada. Asimismo, puede haber manojos de fibras teñidos alrededor del núcleo; éstos tienen forma espiralada. Los núcleos y los nucléolos son negativos.

4.6 Negativo

4.6.1 Ejemplo 1

El citoplasma o los núcleos celulares no muestran prácticamente nada de fluorescencia verde. Las manchas verdes aisladas, a menudo irregulares, que se pueden ver en el campo de observación, pueden representar acumulaciones del conjugado. Las estructuras celulares pueden tener un color pardusco (p.ej., los nucléolos), en especial en preparados viejos o en preparados que se han almacenado con reactivos para protegerlos de la decoloración. Los detritos celulares también pueden producir artefactos con fluorescencia verde.

4.6.2 Ejemplo 2

Se muestra una fluorescencia verdosa muy apagada de los núcleos y del citoplasma, cuya intensidad es el resultado de una muestra débilmente positiva. La evaluación de estas muestras puede hacerse de forma óptima, incluyendo siempre en los procedimientos de prueba diarios una muestra débilmente positiva para ANA, una muestra negativa para ANA y una muestra intensamente positiva para ANA como controles.

4.7 No evaluable

Cualquier otro patrón relacionado con organelas o estructuras subcelulares que todavía no figura en la taxonomía de clasificación.

4.8 Anexo

Los laboratorios que usan cortes de tejidos hechos con criostato, p.ej. hígado o riñón de roedores, para el diagnóstico de ANA, no podrán reconocer los siguientes patrones de fluorescencia: núcleos celulares moteados pleomórficos, patrón de centrómero, puntos nucleares múltiples, puntos nucleares „coiled" (coiled body pattern), algunos patrones nucleolares y la mayoría de los patrones citoplasmáticos. Los patrones del huso mitótico tampoco serán reconocidos. Los patrones mitocondriales pueden verse en la mayoría de los tejidos como un patrón moteado grueso, que antiguamente se detectaba en cortes de tejido renal de animales. La fluorescencia leve de la membrana nuclear se ve a menudo muy débil en cortes de hígado de rata. El título positivo límite para ANA en células HEp-2 es habitualmente superior a 1:80; cuando se usan cortes de tejido es por lo general inferior a ese valor.

A menudo, un suero muestra varios patrones de fluorescencia diferentes, p.ej., múltiples puntos nucleares junto con patrones mitocondriales (ambos son característicos de la colangitis biliar primaria) y el patrón nuclear moteado pleomórfico junto con una tinción homogénea del núcleo, moteado grueso o fino (que son característicos del lupus eritematoso sistémico). Asimismo, a menudo se encuentra el patrón de centrómero junto con el patrón mitocondrial.

Debe hacerse notar que algunos laboratorios y pruebas usan conjugados FITC que están dirigidos contra todas las clases de inmunoglobulinas. El presente glosario se basa en los resultados obtenidos con conjugados específicos para IgG.

5. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

Se analizaron ciento treinta y ocho muestras congeladas con dos lotes de reactivos de otro fabricante, así como con dos lotes de ***AESKUSLIDES®***. Las 118 muestras clínicas llevaban varios años almacenadas y correspondían a pacientes en los que se estaba determinando la presencia de enfermedad reumática. Además, se incluyeron veinte muestras obtenidas en una feria de la salud. Estas 20 muestras representaban a una población sin síntomas clínicos conocidos de enfermedad reumática. Se realizó la comparación de ambos kits para demostrar la comparabilidad entre los sistemas de ANA HEp-2 de dos empresas independientes, incluida la uniformidad de los patrones.

a. Tabla 1: Intervalos de confianza para el conjunto de datos combinados

		Kit de comparación		
		Positivo	Negativo	Total
AESKUSLIDES® ANA HEp-2	Positivo	116	0	116
	Negativo	0	22	22
	Total	116	22	138

% de concordancia de positivo = 116/116 = 100 % (I.C. del 95 %: 96,8 - 100 %)
% de concordancia de negativo = 22/22 = 100 % (I.C. del 95 %: 85,1 - 100 %)

b. Tabla 2: Comparación de patrones entre kit de comparación y Aesku para conjunto de datos combinados

Patrón	n	Kit de comparación	*AESKUSLIDES®*
Homogéneo	32	32	32
Moteado	82	82	82
Nucleolar	20	20	20
Centrómero	6	6	6
Periférico	3	3	3
Membrana nuclear	1	1	1

N =144[2]

Las muestras clínicas representaron la gama completa de enfermedades autoinmunitarias, entre ellas, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, esclerodermia-CREST, síndrome de Sjögren, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome antifosfolipídico, artritis reumatoide, polimiositis/dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico inducido por fármacos, etc.

5.1 Reproducibilidad y precisión

Se analizaron tres LOTES diferentes de ***AESKUSLIDES®*** con 15 muestras de suero que abarcan el conjunto completo de patrones. Se diluyeron dichas muestras al 1:40 como mínimo y al 1:10240 como máximo, y se analizó cada dilución en dos lectores independientes con los tres LOTES. Los criterios de aceptación contemplaban una desviación de +/- 1 en la intensidad de fluorescencia. Se cumplieron los criterios de aceptación para todas las muestras, todas las diluciones, todos los LOTES y todos los lectores independientes.

[2] La discrepancia entre N=138 en la tabla 1 y N=144 en la tabla 2 deriva del hecho de que algunas muestras no presentan ningún patrón (por ejemplo, la número 5) y otras presentan dos patrones (como la número 2). En la tabla 2, solamente hacemos referencia al número de patrones.

6. HOJA DE INTERPRETACIÓN DE DATOS

ANA HEp-2

Fecha:	Lote:
Portaobjetos n º:	Técnico:

Pocillo n.º	ID	Factor de dilución	F.I.	Cromosomas (mitosis)	Nucleoplasma	Nucléolo	Citoplasma	Autoanticuerpos	Comentarios
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									

7. CONTENIDO DEL KIT ESTÁNDAR

		PORTAOBJETOS				CONJUGADO			CONTROL POSITIVO		
Ref. del kit	**Descripción del kit**	**Ref.**	**Pocillos**	**Recubiertos con**	**Cantidad**	**Ref.**	**Descripción**	**Cantidad**	**Ref.**	**Descripción**	**Cantidad**
51.100	**ANA HEp-2** (12 pocillos)	**S51.100**	12	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1x 4,8 ml	**PC51.100**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.101	**ANA HEp-2** (12 pocillos)					**C51.101**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo (H+L)		**PC51.101**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.100. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pocillos) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	2x 10 ml	**PC51.100**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.101. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pocillos) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo (H+L)		**PC51.101**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml

		PORTAOBJETOS				CONJUGADO			CONTROL POSITIVO		
Ref. del kit	**Descripción del kit**	**Ref.**	**Pocillos**	**Recubiertos con**	**Cantidad**	**Ref.**	**Descripción**	**Cantidad**	**Ref.**	**Descripción**	**Cantidad**
51.180	**ANA HEp-2** (18 pocillos)	**S51.180**	18	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	1x 10 ml	**PC51.100**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181	**ANA HEp-2** (18 pocillos)					**C51.101. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo (H+L)		**PC51.101**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.180. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pocillos) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo	3x 10 ml	**PC51.100**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pocillos) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Tapón azul: solución ligeramente azulada. Contiene: BSA, Fluoresceína (FITC)-anti-humano marcado anticuerpo (H+L)		**PC51.101**	Control de patrones de ANA (homogéneo) Tapón rojo: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml

NOTA: el contenido del resto de los componentes de los kits, es decir, reactivos comunes (control negativo, medio de montaje, etc.) se describe más adelante en la sección 8 CONTENIDO DE LOS REACTIVOS COMUNES.

8. CONTENIDO DE REACTIVOS COMUNES

8.1 Reactivos comunes

Ref. del kit	Cantidad	Ref.	Reactivo	Volumen	Descripción	Preparado para usar
Todos kits	1x	**NCIFA**	Control negativo	0,5 ml	Tapón verde: solución incolora. Contiene: suero humano (diluido), azida sódica < 0,1 % (conservante)	SÍ
Todos kits	1x	*** EBIFA**	Azul de Evans 0,2 %	1,5 ml	Tapón blanco: solución de color azul Contiene: PBS, azul de Evans. Diluya el azul de Evans 0,2 % a 1:3000 en 1 WBIFA	NO
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**MMIFA**	Medio de montaje	8 ml	Validado para su uso con HELMED® o HELIOS® Tapón blanco: solución incolora. Contiene: PBS, glicerina.	SÍ
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x	**MMIFA.BULK**	Medio de montaje	12 ml		
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**WBIFA**	Solución de tampón para lavado (10x)	100 ml	Tapón blanco: solución incolora. Diluya la solución de tampón concentrada a 1:10 en agua destilada (por ejemplo: 100 ml + 900 ml). Contiene: PBS, azida sódica (conservante).	NO
51.100.Bulk5; 1.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					
51.100; 51.101	1x	**SBIFA**	Solución de tampón para Muestra (1x)	70 ml	Tapón blanco: solución incolora. para la dilución de los sueros de paciente Contiene: BSA, PBS, azida sódica (conservante).	SÍ
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5	3x					
51.180; 51.181	1x			100 ml		
51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					

Las cantidades son por kit. (*) debe pedirse por separado.

8.2 Materiales necesarios no suministrados

1. Agua destilada
2. Tubos de ensayo para dilución de muestras
3. Frasco para medición
4. Pipeta volumétrica
5. Temporizador
6. Microscopio de fluorescencia con sistema FITC, (filtro de excitación de 490 nm, filtro de barrera de 510 nm)
7. Bandeja de incubadora
8. Plato de tinciones
9. Puntas de pipeteado
10. Cubreobjetos (24 x 60 mm)
11. exprimir frasco lavador

En caso de que observe defectos o datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

9. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Almacene todos los reactivos entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, protegidos de la luz intensa. La fecha de caducidad de cada componente se indica en la etiqueta correspondiente. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

Almacene todos los reactivos y los portaobjetos entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, en los contenedores originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas permanecen estables durante al menos una semana a una temperatura entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. **Los reactivos y los portaobjetos deben usarse sólo antes de la fecha de caducidad que figura en cada componente.**

10. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

c. Riesgos para la salud

ESTE PRODUCTO DEBE UTILIZARSE SÓLO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO. Sólo el personal capacitado y específicamente informado sobre métodos de diagnóstico in vitro puede usar el kit. Los reactivos contenidos en este producto no se consideran tóxicos ni peligrosos cuando se usan según las instrucciones; a pesar de ello, para garantizar la máxima seguridad para el usuario respete las siguientes:

Recomendaciones y precauciones

Este kit contiene reactivos potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del kit no están clasificados como irritantes de la piel y los ojos, se recomienda evitar el contacto con los mismos y usar guantes desechables.

Todo el material de origen humano utilizado para algunos de los reactivos de este kit (por ejemplo, controles) se ha analizado mediante métodos aprobados y ha resultado negativo para HbsAg, hepatitis C y VIH. Sin embargo, en el caso de material de origen humano, no se puede garantizar la ausencia completa de virus. Por consiguiente, los controles del kit y las muestras de pacientes deben considerarse potencialmente infecciosos y deben manipularse de acuerdo con los requisitos nacionales.

El kit contiene material de origen animal (BSA, Inmunoglobulina) como se indica en la tabla de contenidos, proceda de acuerdo con la normativa de su país.

d. Instrucciones generales

1. No pipetee con la boca. No fume, coma ni beba mientras trabaja con el kit.
2. No mezcle reactivos ni instrumental provenientes de diferentes números de lote. Esto puede conducir a alteraciones en los resultados de la prueba.
3. Mantenga todos los recipientes herméticamente cerrados después de usarlos, para evitar la contaminación bacteriana.
4. Siempre use puntas para pipeta estériles y nuevas para todos los componentes.
5. Nunca exponga los componentes a temperaturas superiores a 37 °C / 98,6 °F. (excepto MMIFA)
6. Nunca deje secar los portaobjetos durante el procedimiento.
7. Nunca congele los portaobjetos.

Se aconseja que cada laboratorio establezca sus propios valores normales, de acuerdo con sus propias técnicas, controles, equipos y población de pacientes.

No puede hacerse un diagnóstico clínico definitivo sólo sobre la base de los resultados del análisis efectuado, sino que debe ser realizado por el médico después de evaluar todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

Si los resultados del ensayo no se encuentran en el intervalo aceptable de los controles, el test no es válido y debe repetirse. Debe comprobar lo siguiente: fecha de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de conservación, pipetas y cualquier otro material utilizado, fotómetro, tiempos de incubación y métodos de lavado. Si tras comprobar los aspectos previos no ha detectado ningún error, le rogamos que contacte con el fabricante o su proveedor:

11. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Preparación de las muestras: Se recomienda usar muestras de suero recién obtenidas. La extracción de sangre debe hacerse observando los requisitos nacionales. Tome las muestras de sangre de forma aséptica.

No usar muestras lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas con bacterias.

Se debe eliminar el material particulado del suero por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben recogerse en tubos limpios, secos y vacíos. Después de la separación, las muestras de suero deben usarse directamente durante las primeras 8 horas, almacenarse bien cerradas entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F por un máximo de 2 semanas o congelarse a -20 °C / -4 °F para conservarlas durante periodos más prolongados. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

12. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

e. Preparación

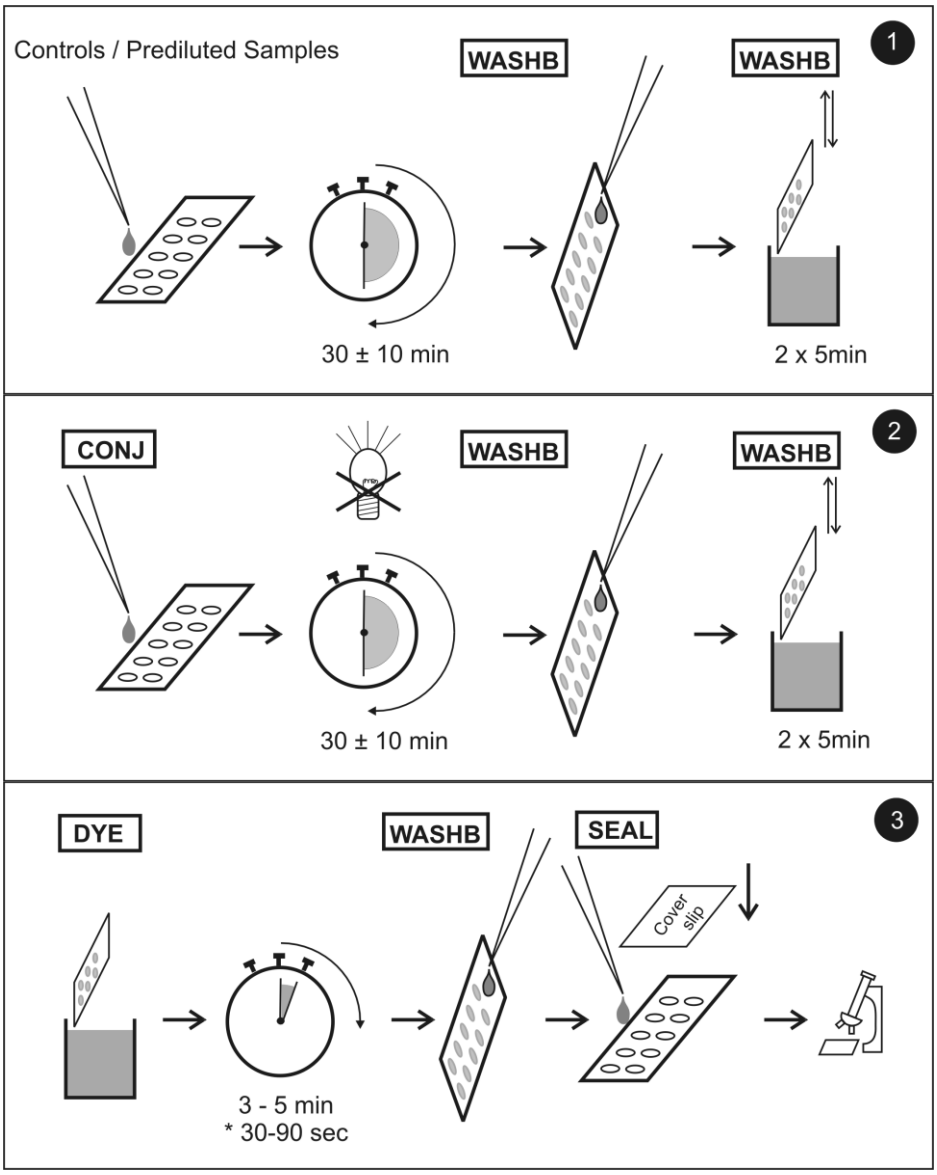
Deje que todos los componentes lleguen a temperatura ambiente (20-26 °C / 68-78,8 °F) antes de usarlos, mézclelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para obtener un rendimiento óptimo de la prueba.

1. Preparación de la solución de tampón para lavado: diluya la solución de tampón concentrada a 1:10 con agua destilada.
2. Dilución de las muestras: diluya el suero del paciente (para ver el título de tamizaje, consulte la sección ***Procedimiento con el kit*** anterior, de acuerdo con la referencia de producto que esté utilizando) con 1 solución de tampón para muestra. Varían entre los kits de HEp-2, ADNn, rLKS, EMA, etc.
3. Los controles están listos para usarse.
4. Preparación de un protocolo: las hojas de interpretación de datos están disponibles en la sección ***Procedimiento con el kit*** de acuerdo con la referencia del producto que esté utilizando.
5. En caso de aumento de la viscosidad o la opacidad, el reactivo de medio de montaje (MMIFA) debe calentarse en un baño de agua durante 15 minutos a 56 °C / 132,8 °F y después debe dejarse que alcance la temperatura ambiente (20-26 °C / 68-78,8 °F) Tras este procedimiento, el reactivo calentado se puede utilizar hasta 21 días consecutivos, suponiendo que se almacene a entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F, como se indica en la etiqueta del reactivo y en las instrucciones de uso.

f. Procedimiento de la prueba

N.º	Descripción del paso
1.	Extraiga los portaobjetos necesarios de sus envases y rotúlelos. No toque la capa de tejidos o células. Nunca deje secar los portaobjetos.
2.	**Preparación de la bandeja de la incubadora:** Coloque una pequeña cantidad de agua desionizada o destilada en una cámara de incubación y coloque las láminas sobre los soportes adecuados dentro de ésta. Incube la lamina (s) 30 ± 10 minutos a temperatura ambiente en la cámara de incubación húmeda. Utilice tiempos de incubación consistentes con el conjugado. **Primera incubación:** Pipetee un volumen adecuado de cada suero diluido y controles (listos para usarse) en los pocillos adecuados. Evite el contacto directo de la pipeta con la superficie del portaobjetos. Asegúrese de que cada área de prueba quede cubierta por completo con el suero o el control correspondientes. Es importante usar la cantidad de material a probar suficiente para cubrir por completo cada pocillo. Pero debe evitarse que se mezclen entre ellos, ya que esto puede producir resultados incorrectos.
3.	**Lavado**: Después de la incubación, remueva las láminas de la cámara de incubación y lávelas brevemente con tampón de lavado usando un frasco lavador. No aplique directamente el chorro del tampón sobre los pozos NOTA: Para evitar contaminación cruzada, incline levemente la lámina primero hacia una fila y lave cuidadosamente con el chorro de tampón de lavado a lo largo de la línea media de la lámina, esto permite que el tampón de lavado salga fuera del borde inferior de la lámina. Luego incline la lámina hacia la otra fila, y repita este procedimiento con el tampón de lavado. Lave la lámina (s) 10 minutos con tampón de lavado en un plato de tinción de portaobjetos. Evite el contacto directo de los elementos sólidos con el sustrato. Para obtener resultados óptimos cambie la solución de tampón de lavado una vez, después de 5 minutos de incubación. Levante la lámina (s) del plato tinción y retire con cuidado el exceso de tampón de lavado. NOTA: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante el procedimiento, ya que eso puede provocar daños en el sustrato. Por favor,no seque el portaobjetos con papel absorbente ni de cualquier otra manera, no permita que la lámina quede sin reactivo de anticuerpos fluorescentes durante más de unos pocos segundos.
4.	**Segunda incubación**: Después del lavado, coloque los portaobjetos de inmediato en la cámara húmeda y cubra todas las zonas de prueba con una cantidad suficiente del conjugado marcado con FITC, de tal forma que la zona de prueba esté totalmente cubierta. Incube la lamina (s) 30 ± 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
5.	**Lavado:** Después de la incubación, remueva las láminas de la cámara de incubación y lávelas brevemente con tampón de lavado usando el frasco lavador. No aplique directamente el chorro del tampón sobre los pozos. Lave la lámina (s) 10 minutos con tampón de lavado en un plato de tinción de portaobjetos. Evite el contacto directo de los elementos sólidos con el sustrato. Para obtener resultados óptimos cambie la solución de tampón de lavado una vez después de 5 minutos de incubación.
6.	***Tinción de contraste optativa**: Diluya el colorante de contraste (azul de Evans) 1:3000 en tampón para lavado y mezcle bien. Vierta el colorante de contraste en un plato de tinciones e incube en él los portaobjetos. Consulte la sección Procedimiento con el kit anterior con la referencia del producto que esté usando para obtener detalles sobre el tiempo de incubación. El azul de Evans oculta la fluorescencia inespecífica de fondo. Retire los portaobjetos una vez transcurrido el tiempo de incubación y enjuáguelos brevemente con tampón de lavado. Elimine cuidadosamente el exceso de tampón de lavado. No seque los portaobjetos con papel absorbente; asimismo, nunca deben someterse a este tipo de secado.
7.	**Montaje**: Coloque un volumen adecuado de medio de montaje (Mounting Medium) a lo largo de la línea media del portaobjetos. Coloque cuidadosamente un cubreobjetos sobre el medio de montaje, evitando formar burbujas de aire.
8.	**Observación microscópica**: Lea los portaobjetos de inmediato con un aumento total de 400 a 800 x en un microscopio de fluorescencia (filtro excitador de 490 nm, filtro barrera de 510 nm).

g. Flujo de trabajo



13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

ERROR	CAUSAS POSIBLES	SOLUCIÓN
Baja densidad celular	• Lisis celular por contacto prolongado con agua desionizada. • Tampón vertido directamente sobre las células	Observe el procedimiento de lavado
	Enzimas proteolíticas han atacado al sustrato	Inactive el suero
Fluorescencia irregular	El suero se ha secado en el pocillo, fluorescencia más intensa en los bordes	Incubar siempre en un medio ambiente húmedo
	El suero no cubrió el área de prueba	Coloque un volumen adecuado de material a probar
	Reacción cruzada entre áreas de prueba	Evite que se mezcle el contenido de las áreas de prueba durante la primera incubación Use un lápiz de grafito
	El rotulado del portaobjetos con un lápiz de cera produjo una película sobre el portaobjetos	Use un lápiz de grafito
	Microscopio regulado de forma incorrecta	Verifique la vida útil de la lámpara UV
Imagen difusa	Los portaobjetos se almacenaron en el refrigerador sin taparlos	Selle el portaobjetos con laca de uñas o cera de parafina
	El microscopio de fluorescencia está sucio. Posiblemente las lentes están rayadas	Limpie el microscopio de acuerdo con sus instrucciones de mantenimiento
Poca fluorescencia o ninguna	Conjugado y portaobjetos descongelados y vueltos a congelar	Almacenar el conjugado y los portaobjetos entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F.
	Controles diluidos	Lea las instrucciones, use los controles listos para usar del kit
	• Contaminación bacteriana de los sueros o del conjugado • Microscopio no regulado • pH del tampón de lavado demasiado bajo (pH 7,4 ± 0,2)	Verifique las condiciones de la prueba
	El conjugado FITC se ha expuesto a la luz	Almacene el conjugado protegido de la luz
Fluorescencia de fondo	• Lavado incorrecto • El portaobjetos se ha secado • Sueros lipémicos o hemolizados • Error del microscopio	• Revise las instrucciones de lavado • No deje que los portaobjetos se sequen • Use sólo sueros recién obtenidos • Verifique que el filtro y el objetivo sean los correctos

14. SÍMBOLOS REGLAMENTARIOS

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	