

### **NOTA IMPORTANTE:**

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

**ININ/ Oficina Nacional de Normalización**

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

**NC-ISO 19001: 2005  
(Publicada por la ISO, 2002)**

---

**PRODUCTOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO—  
INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL FABRICANTE  
CON LOS REACTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO  
UTILIZADOS PARA TINCIÓN EN BIOLOGÍA  
(ISO 19001:2002, IDT)**

**In vitro diagnostic medical devices— Information supplied by the  
manufacturer with in vitro diagnostic reagents for staining in biology**

---

**ICS: 11.100**

**1. Edición      Octubre 2005  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

**Oficina Nacional de Normalización Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.  
Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048 Correo electrónico: nc@ncnorma.cu**



**Cuban National Bureau of Standards**

## Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencia de consenso.

### Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el CTN No.102 de Laboratorios Clínicos y Diagnosticadores en el que están representadas las instituciones siguientes:
  - Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, MINSAP
  - Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, MINFAR
  - Centro Nacional de Biopreparados, Consejo de Estado
  - Centro Nacional de Seguridad Biológica, CITMA
  - Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Consejo de Estado
  - Facultad de Ciencias Médicas de Las Tunas, MES
  - Hospital Universitario Manuel Fajardo, MINSAP
  - Hospital Hermanos Ameijeiras, MINSAP
  - Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey, MINSAP
  - Instituto de Hematología e Inmunología, MINSAP
  - Instituto de Investigaciones en Normalización, ONN
  - Oficina Nacional de Normalización, CITMA
  - Universidad de La Habana, MES
- Es una adopción idéntica de la Norma ISO 19001:2002 Productos para el diagnóstico in vitro-información proporcionada por el fabricante con los reactivos para el diagnóstico in vitro utilizados para tinción en biología. Ha sido contrastada con la UNE-EN-ISO 19001:2002.
- Presenta los siguientes cambios editoriales:
  - Se sustituye el término “Norma Internacional” por “Norma Cubana”.
  - Se incluye una Introducción Nacional.
  - Se incluye el Anexo B (informativo) donde se establece correspondencia entre los términos y definiciones de esta Norma Cubana y la NC 376:2004 Terminología sobre Laboratorios Clínicos y Diagnosticadores.
- Consta de los Anexos A y B.

### © NC, 2005

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC)**

**Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

### **Introducción Nacional**

Los reactivos para tinción en biología no se encuentran actualmente entre los diagnosticadores que deben ser inscritos en el Registro sanitario en nuestro país. Por lo que es importante adoptar una norma que especifique los requisitos que debe cumplir la información proporcionada por el fabricante con estos reactivos, con el propósito de contribuir a la correcta utilización de los mismos en los laboratorios.

Esta Norma Cubana (NC) es aplicable a los fabricantes, proveedores y vendedores de colorantes, tinturas, reactivos cromogénicos, y de otros reactivos utilizados para tinción en biología. Es recomendable que los profesionales relacionados con el objeto de esta NC divulguen y estudien el contenido de la misma como premisa para la futura generalización.

Indice

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Página</b>
Introducción.....	5
1 Objeto y campo de aplicación .....	6
2 Referencias normativas .....	6
3 Términos y definiciones.....	6
4 Requisitos de la información proporcionada por el fabricante.....	8
Anexo A (Informativo) .....	12
Anexo B (Informativo) .....	24
Bibliografía.....	25

## 0 Introducción

Esta Norma Cubana se relaciona con la NC-EN 375:2005 y EN 376:2005 y deberá utilizarse conjuntamente con estas.

La utilización de los reactivos para la tinción en biología, así como los ejemplos específicos de la información proporcionada por el fabricante para los cuatro procedimientos de tinción presentados en el anexo A se basan en un concepto europeo; tal información constituye la justificación científica de los requisitos enumerados en el capítulo 4. Esta información se da para facilitar a los fabricantes, proveedores y vendedores de colorantes, tinturas, reactivos cromogénicos, y de otros reactivos utilizados para tinción en biología, el cumplimiento de los datos específicos que se requieren del producto.

## PRODUCTOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO — INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL FABRICANTE CON LOS REACTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO UTILIZADOS PARA TINCIÓN EN BIOLOGÍA

### 1 Objeto y campo de aplicación

Esta Norma Cubana especifica los requisitos para la información proporcionada por el fabricante con los reactivos utilizados para la tinción en biología. Es aplicable a los fabricantes, proveedores y vendedores de colorantes, tinturas, reactivos cromogénicos, y de otros reactivos utilizados para tinción en biología. Los requisitos para la información proporcionada por el fabricante especificado en esta norma cubana son un requisito previo para alcanzar resultados comparables y reproducibles en todos los campos de tinción en biología.

### 2 Referencias Normativas

Los documentos que se mencionan seguidamente son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, sólo se toma en consideración la edición citada (incluyendo todas las enmiendas).

ISO 31 – 8:1992 Magnitudes y unidades. Parte 8: Química física y física molecular.

ISO 1000 – Unidades SI y recomendaciones para el empleo de sus múltiplos y submúltiplos y de algunas otras unidades.

NC-EN 375:2005 – Sistemas de diagnóstico in vitro. Requisitos para el etiquetado a los reactivos para el diagnóstico para el uso profesional.

EN 376:2002\* – Sistemas de diagnóstico in vitro. Requisitos para el etiquetado a los reactivos para el diagnóstico para el uso como autodiagnóstico. \*(En proceso de adopción).

### 3 Términos y Definiciones

A los efectos de esta norma, son aplicables las definiciones siguientes:

#### 3.1 Información proporcionada por el fabricante

Toda la información impresa, escrita, gráfica u otra información anexada o que acompañe a un reactivo para el diagnóstico in vitro.

#### 3.2 Etiqueta

Cualquier información impresa, escrita o gráfica colocada sobre un recipiente [NC-EN 375].

#### 3.3 Reactivo para el diagnóstico in vitro

Cualquier producto consistente en un reactivo, producto reactivo, conjunto, instrumento, dispositivo o sistema utilizado solo o en combinación, destinado por el fabricante a utilizarse in vitro en el examen de muestras procedentes del cuerpo humano con objeto de proporcionar datos sobre estados fisiológicos, o estados de salud o de enfermedad o anomalías congénitas.

### 3.4 tinción

Acción de impartir color a un material mediante una reacción con un colorante o reactivo cromogénico.

### 3.5 colorante

Compuesto orgánico coloreado, que una vez disuelto en un disolvente apropiado, puede conferir color a un material.

**NOTA:** El origen físico del color es la absorbancia (o emisión) selectiva en la región visible del espectro electromagnético entre 400 nm y 800 nm. Los colorantes son moléculas con sistemas extensos de electrones deslocalizados (sistemas constituidos por enlaces  $\pi$  conjugados). Las características de la absorbancia de luz de los colorantes se muestran por sus espectros de absorción, que resultan de representar gráficamente la absorbancia de luz frente a la longitud de onda. La forma de los espectros y la longitud de onda de la máxima absorbancia dependen de la estructura química del colorante, del disolvente, y de las condiciones de las mediciones espectrales.

### 3.6 tintura

Solución de uno o más colorantes a concentraciones definidas en un disolvente definido, utilizada para la tinción.

**NOTA:** La tintura puede prepararse disolviendo directamente el colorante en el disolvente o por dilución de una solución de reserva con agentes adecuados.

3.6.1 solución colorante de reserva: Solución estable definida de uno o más colorantes a una concentración superior a aquella utilizada para la tinción.

**NOTA:** La estabilidad se refiere a propiedades constantes del colorante, incluso en presencia de otros colorantes.

### 3.7 reactivo cromogénico

Reactivo que reacciona con ciertos grupos químicos presentes o inducidos en las células y tejidos, con formación in situ de un compuesto coloreado.

EJEMPLO: Reactivos cromogénicos típicos son:

- a) las sales de diazonio;
- b) el reactivo de Schiff.

### 3.8 fluorocromo

Reactivo que emite luz visible cuando se le irradia con luz de excitación de longitud de onda más corta.



### 3.9 anticuerpo

Inmunoglobulina específica formada por linfocitos B en respuesta a la exposición a una sustancia inmunogénica y capaz de formar enlaces con la misma.

**NOTA:** La molécula de una sustancia inmunogénica contiene una o más partes con una composición química característica, denominada epitopo.

#### 3.9.1 anticuerpo policlonal

Mezcla de anticuerpos capaces de reaccionar de forma específica con una cierta sustancia inmunogénica.

#### 3.9.2 anticuerpo monoclonal

Anticuerpo capaz de reaccionar de forma específica con un solo epitopo de una cierta sustancia inmunogénica.

### 3.10 sonda de ácido nucleico

Oligonucleótido o polinucleótido de cadena sencilla de longitud definida, que es complementario de secuencias específicas de nucleótidos en los ácidos nucleicos.

### 3.11 lectina

Proteína de origen no inmunogénico con dos o más sitios de enlace, que reconoce y forma enlaces con residuos sacáridos específicos.

## 4 Requisitos de la información proporcionada por el fabricante

### 4.1 Requisitos generales

#### 4.1.1 Información proporcionada por el fabricante con los reactivos utilizados para la tinción en biología.

La información proporcionada por el fabricante con los reactivos utilizados para la tinción en biología deberá cumplir las Normas NC-EN 375, EN 376, ISO 31-8 e ISO 1000. Deberá prestarse una atención especial a las precauciones dadas en la Norma NC-EN 375. Además, cuando proceda, los requisitos especificados en los apartados 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4 deberán aplicarse a estos reactivos.

#### 4.1.2 Identidad del producto

El nombre del producto deberá incluir el número de registro CAS y, cuando proceda, el nombre y número del índice de color.

**NOTA:** Los números de registro CAS son los números de registro en el "Chemical Abstracts Service". Estos son códigos numéricos específicos del producto y asignados a las sustancias químicas recogidas en un índice por Chemical Abstracts.

**NOTA:** El índice de color se compone de un mínimo de 5 dígitos, el número C.I. y de un nombre especialmente construido para la mayoría de los colorantes.

#### 4.1.3 Descripción del reactivo

La descripción del reactivo deberá incluir los datos físico-químicos apropiados acompañados de las hojas de datos pertinentes para cada lote. Los datos deberán contener como mínimo:

- a) la fórmula molecular, incluidos ambos iones;
- b) la masa molar (g/mol) indicando claramente si este valor incluye o no a ambos iones;
- c) los límites permisibles de las sustancias interferentes.

Para compuestos orgánicos coloreados, los datos deberán también contener:

- d) la absorbancia molar (este dato puede sustituirse por el contenido de la molécula colorante pura, pero no por el contenido de colorante total);
- e) la longitud de onda o número de onda en el máximo de absorbancia;
- f) los datos de cromatografía en capa fina, cromatografía en fase líquida de alta resolución o cromatografía en capa fina de alta resolución.

#### 4.1.4 Utilización prevista

Deberá proporcionarse una descripción dando una guía para la tinción en biología y para los procedimientos cualitativos y cuantitativos (si procede). Esto deberá incluir la información siguiente:

- a) el tipo de material biológico, la manipulación y el tratamiento antes de la tinción, por ejemplo:
  - si pueden o no utilizarse muestras de células, de tejido o de ambos;
  - si puede o no utilizarse material congelado, fijado químicamente o ambos;
  - el protocolo para el procesado del tejido;
  - cuál de los medios de inclusión puede utilizarse;
- b) los detalles de un procedimiento de reacción adecuado utilizado por el fabricante para ensayar la reactividad del colorante, tintura, reactivo cromogénico, fluorocromo, anticuerpo, sonda de ácido nucleico o la lectina utilizados para tinción en biología;
- c) el resultado esperado cuando se utiliza el procedimiento de reacción en el tipo de material sugerido en el modo indicado por el fabricante;
- d) las notas sobre el tejido adecuado para los controles positivo y negativo y las indicaciones sobre la interpretación del resultado;
- e) las referencias a los resultados obtenidos publicados utilizando el producto de la forma sugerida por el fabricante.

## 4.2 Requisitos adicionales para clases específicas de reactivos

### 4.2.1 Fluorocromos

Independiente del tipo de aplicación, los fluorocromos que se ofrecen para tinción en biología deberán ir acompañados de la información siguiente:

- a) selectividad, es decir una descripción del objetivo que puede demostrarse utilizando las condiciones especificadas;
- b) las longitudes de onda de excitación y de emisión;
- c) para los fluorocromos conjugados con anticuerpos, el cociente fluorocromo/proteína (F/P).

### 4.2.2 Sales metálicas

Cuando se ofrezcan compuestos metálicos para utilización en procedimientos de captación de un ión metálico para tinción en biología, deberá incluirse la información adicional siguiente:

- a) el nombre sistemático;
- b) la pureza.

### 4.2.3 Anticuerpos

Los anticuerpos que se ofrecen para tinción en biología deberán ir acompañados de la información siguiente:

- a) una descripción del antígeno (sustancia inmunogénica) contra el cual se produjo el anticuerpo y si el antígeno está definido por el marcador de una clase de diferenciación, su número CD correspondiente. Esta descripción deberá contener, cuando sea apropiado, el tipo de (macro)molécula detectada, que parte de la molécula es detectada, su localización celular, y en qué células y/o tejidos se encuentra, junto con cualquier reactividad cruzada con otros epítomos;
- b) para anticuerpos monoclonales, el clon, el método de producción (fluido sobrenadante del cultivo tisular o fluido ascítico), subclase de la inmunoglobulina e identidad de la cadena ligera;
- c) para anticuerpos policlonales, el hospedero animal y si se utiliza suero entero o la fracción de gammaglobulinas;
- d) una descripción de la forma (solución o polvo liofilizado), cantidad de proteína total y anticuerpo específico y si está en solución, la naturaleza y concentración del medio o diluyente a utilizar;
- e) si procede, una descripción de cualquier encadenador o agente extensor molecular añadido al anticuerpo;
- f) una declaración de la pureza, técnicas de purificación y método de detección de la impureza (por ejemplo Western Blot, inmunoquímica);
- g) las referencias apropiadas a las publicaciones relacionados con la aplicación del anticuerpo.

#### 4.2.4 Sondas de ácidos nucleicos.

Las sondas de ácidos nucleicos que se ofrezcan para tinción en biología deberán ir acompañadas de la información siguiente:

- a) la secuencias de bases y si la sonda es de doble o simple cadena;
- b) la masa molar de la sonda o el número de bases, y si procede, la fracción numérica (en porcentaje) de pares de bases guanina-citosina;
- c) el marcador utilizado (isótopo radiactivo o molécula no radiactiva). Para marcadores no radiactivos , el(los) extremo(s) de unión a la sonda (3' y/o 5') y la fracción de la sustancia en el porcentaje de la sonda marcada;
- d) el gen objetivo (secuencia de ADN o ARN) detectado;
- e) una descripción de la forma (polvo liofilizado o solución) y la cantidad (pg o pmol) o la concentración (pg/mL o pmol/mL) según proceda, y si está en solución, la naturaleza y la concentración del diluyente o del medio;
- f) una declaración de la pureza, técnicas de purificación y métodos de detección de la impureza (por ejemplo, cromatografía en fase líquida de alta resolución HPLC);
- g) las referencias apropiadas a las publicaciones referentes a la descripción del origen de la secuencia de DNA, a la existencia de cualquier patente conocida e sobre la información aplicación de la sonda de ácido nucleico.

**Anexo A**  
(informativo)

**Ejemplos de información proporcionada por el fabricante con reactivos comúnmente utilizados en procedimientos de tinción en biología**

**A.1 General**

La información a continuación se aporta como un ejemplo y no deberá considerarse como la única forma en que puede efectuarse este procedimiento. Estos procedimientos pueden utilizarse por el fabricante para ensayar la reactividad de los colorantes e ilustra la forma en que el fabricante puede presentar la información para cumplir con esta norma cubana.

**A.2 Colorante verde metilo – pironina Y****A.2.1 Colorante verde de metilo**

La información sobre el colorante verde de metilo es la siguiente:

## a) Identidad del producto:

- Verde de metilo (sinónimos: Double Green SF, Light Green);
- Número de registro CAS: 22383-16-0;
- Nombre y número del índice de color: Basic Blue 20, 42585.

## b) Composición:

- Fórmula molecular incluido el anión:  $C_{26}H_{33}N_3^{2+} 2 BF_4^-$ ;
- Masa molar con (y sin) el anión: 561,17 g/mol (387,56 g/mol);
- Fracción de masa (contenido) del catión del verde de metilo: 85 %, determinada por espectrometría de absorción;
- Límites permisibles de sustancias interferentes, expresados como fracciones de masas;
  1. agua: Inferior al 1 %;
  2. sales inorgánicas: Inferior al 0,1 %;
  3. detergentes: no presentes;
  4. impurezas coloreadas incluyendo el cristal violeta: No detectable por cromatografía de capa fina;
  5. compuestos neutros: 14 % de almidones solubles.

## c) Longitud de onda de la máxima absorbancia de la solución colorante: 633 nm.

## d) Cromatografía en capa fina: Solamente un componente principal presente compatible con el verde de metilo.

## e) Manipulación y almacenamiento: Estable cuando se guarda en un frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (18 °C a 28 °C).

### A.2.2 Colorante verde de etilo

La información sobre el colorante verde de etilo es la siguiente:

a) Identidad del producto:

1. Verde de etilo.
2. Número de registro CAS: 7114-03-6.
3. Nombre y número de índice de color: no existe nombre del índice de color, 42590.

b) Composición:

1. Fórmula molecular incluido el anión:  $C_{27}H_{35}N_3^{2+} 2 BF_4^-$ ;
2. Masa molar con (y sin) el anión: 575,19 g/mol (401,58 g/mol);
3. Fracción de masa (contenido) del catión del verde de etilo: 85 %, determinada por espectrometría de absorción;
4. Límites permisibles de sustancias interferentes, expresados como fracciones de masas:
  - agua: Inferior al 1 %;
  - sales inorgánicas: Inferior al 0,1 %;
  - detergentes: no presentes;
  - impurezas coloreadas incluyendo el cristal violeta: No detectable mediante cromatografía de capa fina;
  - compuestos neutros: 14 % de almidones solubles.

c) Longitud de onda del máximo de absorbancia de la solución colorante: 633 nm.

d) Cromatografía en capa fina: Solamente un componente principal presente compatible con el verde de etilo.

e) Manipulación y almacenamiento: Estable cuando se guarda en un frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (18 °C a 28 °C).

### A.2.3 Colorante pironina Y

La información sobre el colorante pironina Y es la siguiente:

a) Identidad del producto:

1. Pironina Y (Sinónimos: Pironine Y, Pyronin O, Pyronine O).
2. Número de registro CAS: 92-32-0.
3. Nombre y número de índice de color: no existe nombre del índice de color, 45005.

b) Composición:

1. Fórmula molecular incluido el anión:  $C_{17}H_{19}N_2O^+ Cl^-$ .
2. Masa molar con (y sin) el anión: 302,75 g/mol (267,30 g/mol).
3. Fracción de masa (contenido) del catión de pironina Y: 80 %, determinada por espectrometría de absorción.
4. Límites permisibles de sustancias interferentes, expresados como fracciones de masas:

- agua: Inferior al 1 %;
- sales inorgánicas: Inferior al 0,1 %;
- detergentes: no presentes;
- impurezas coloreadas incluyendo el cristal violeta: No detectable por cromatografía de capa fina;
- compuestos neutros: 19 % de almidones solubles.

c) Longitud de onda de la máxima absorbancia de la solución colorante: 550 nm.

d) Cromatografía en capa fina: Solamente un componente principal presente compatible con pironina Y.

e) Manipulación y almacenamiento: Estable cuando se guarda en un frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (18 °C a 28 °C).

#### **A.2.4 Utilización prevista del método de tinción con verde de metilo - pironina Y**

##### **A.2.4 .1 Tipo de material**

La tintura, verde de metilo - pironina Y es usada para secciones de varios tipos de tejidos recientemente congeladas en criostato o incluidas en parafina o plástico.

##### **A.2.4.2 Manipulación y tratamiento antes de la tinción**

Los fijadores recomendados incluyen los siguientes:

- Fluido de Carnoy (Etanol, fracción de volumen (V/V) 99 % + cloroformo + ácido acético, (fracción de masa de 99 %), mezclados como volúmenes en la proporción (60 + 30 + 10 mL) o
- formaldehído (fracción de masa de 3,6 % con solución tampón fosfato (pH= 7,0); deshidratación, clarificación, infiltración e inclusión en parafina de forma rutinaria; preparación de sección con micrótopo.

##### **A.2.4.3 Solución de trabajo**

Se disuelve el verde de etilo o verde de metilo en cantidad correspondiente a una masa de 0,15 g de colorante puro, calculada como catión coloreado (en los ejemplos anteriores 0,176 g en ambos casos), en 90 mL de agua destilada caliente (50 °C).

Se disuelve la pironina Y en cantidad correspondiente a una masa de 0,05 g de colorante puro, calculada como catión coloreado (en el ejemplo anterior 0,038 g) en 10 mL de solución tampón de ftalato 0,1 mol/L (pH=4,0). Esta última solución se mezcla entonces con la solución de verde de etilo o verde de metilo.

##### **A.2.4.4 Estabilidad**

La solución de trabajo es estable durante una semana, si se guarda en un frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (18 °C a 28 °C).

### A.2.4.5 Procedimiento de tinción

**A.2.4.5.1** Se desparafinan las secciones incluidas en la parafina.

**A.2.4.5.2** Se hidratan las secciones.

**A.2.4.5.3** Se efectúa la tinción durante 5 min. A temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) sumergiendo las secciones en la solución de trabajo.

**A.2.4.5.4** Se lava dos cambios de agua destilada de 2 a 3 s en cada uno.

**A.2.4.5.5** Se sacude el exceso de agua.

**A.2.4.5.6** Se agita tres veces en l-butanol.

**A.2.4.5.7** Se monta directamente la muestra extraída del l-butanol en una resina sintética hidrofóbica.

### A.2.4.6 Resultado esperado

Con el tipo de material recomendado:

- a) Para la cromatina nuclear: Verde (fijada en fluido Carnoy) o en azul (fijada en formaldehído).
- b) Para citoplasma rico en nucleolos y ribosomas: Rojo (fijado en fluido Carnoy) o rojo lila (fijado en formaldehído).
- c) Para matriz cartilaginosa y gránulos celulares basófilos: naranja.
- d) Para músculo, colágeno y eritrocitos: no se tiñen.

## A.3 Reacción de Feulgen-Schiff

### A.3.1 Colorante pararosanilina

**Precauciones:** Para R 40: Riesgo posible efectos irreversibles;  
Para S 36/37: Utilícese ropa y guantes protectores adecuados.

La información sobre el colorante pararosanilina es la siguiente:

a) Identidad del producto:

1. Pararosanilina (Sinónimos: rubin básico, parafucsina, paramagenta, magenta O).
2. Número de registro CAS: 569-61-9.
3. Nombre y número de índice de color: Basic Red 9, 42500.

b) Composición:

1. Fórmula molecular incluido el anión:  $C_{19}H_{18}N_3^+ Cl^-$ .
2. Masa molar con (y sin) el anión: 323,73 g/mol (288,28 g/mol).
3. Fracción de masa (contenido) catiónica de pararosanilina: 85 %, determinada por espectrometría de absorción.
4. Límites permisibles de sustancias interferentes, expresados como fracciones de masas:  
- agua: Inferior al 1 %;



- sales inorgánicas: Inferior al 0,1 %;
- detergentes: no presentes;
- impurezas coloreadas: Los homólogos metilados de la pararosanilina pueden estar presentes en trazas detectadas por cromatografía de capa fina. Peor la acridina no deberá hallarse presente.
- compuestos neutros: 14 % de almidones solubles.

c) Longitud de onda del máximo de absorbancia de la solución colorante: 542 nm.

d) Cromatografía en capa fina: Un componente principal consistente con la pararosanilina, homólogos metilados de pararosanilina presentes en trazas.

e) Manipulación y almacenamiento: Estable cuando se guarda en un frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (18 °C a 28 °C).

### **A.3.2 Utilización prevista de la reacción de Feulgen-Schiff**

#### **A.3.2.1 Tipo(s) de material**

La reacción de Feulgen-Schiff es usada para secciones de diversas clases de tejidos incluidas en parafina o plástico: Material citológico (frotis, impresión de tejido, cultivo celular, monocapa).

#### **A.3.2.2 Manipulación y tratamiento antes de la tinción**

##### **A.3.2.2.1 Fijadores recomendados**

Los fijadores recomendados incluyen:

a) Histología: formaldehído (fracción de masa de 3,6 %) con tampón fosfato (pH=7,0).

b) Citología:

- 1) material fijado húmedo: etanol (fracción de volumen de 96 %);
- 2) material secado al aire:
  - solución de formaldehído (fracción de masa de 3,6 %) en tampón fosfato;
  - metanol + solución de formaldehído (fracción de masa de 37 %) + ácido acético (fracción de masa de 100 %) mezclados como volúmenes en la proporción (85+10+5) mL.

El material fijado utilizando el fijador de Bouin no es adecuado para esta reacción.

Detalles del procedimiento utilizado por el fabricante para el ensayo de reactividad del reactivo cromogénico.

##### **A.3.2.2.2 Reactivo de pararosanilina- Schiff**

Se disuelven 0,5 g de cloruro de pararosanilina en 15 mL de ácido clorhídrico 1 mol/L. Se añaden 85 mL de una solución acuosa de  $K_2S_2O_5$  (fracción de masa de 0,5 %). Se esperan 24 h. Se agitan 100 mL de esta solución con 0,3 g de carbón durante 2 min. y se filtra. Se almacena la solución

incolora a una temperatura no inferior a 5 °C. La solución es estable, al menos, durante 12 meses si se almacena en un recipiente herméticamente cerrado.

#### **A.3.2.2.3 Solución de lavado**

Se disuelven 0,5 g de  $K_2S_2O_5$  en 85 mL de agua destilada, se añaden 15 mL de ácido clorhídrico de 1 mol/L. La solución está lista para ser utilizada inmediatamente y puede utilizarse hasta 12 h después de preparada.

#### **A.3.2.3 Procedimiento de tinción**

**A.3.2.3.1** Las secciones en parafina deberán desparafinarse utilizando xileno durante 5 min., seguido de lavados de 2 min. primero en etanol, fracción de volumen (V/V) 99 % y después en etanol, fracción de volumen (V/V) 50 %.

**A.3.2.3.2** Se hidratan las secciones incluidas en plástico, las secciones incluidas en parafina desparafinadas y el material citológico en agua destilada durante 2 min.

**A.3.2.3.3** Se hidroliza el material en ácido clorhídrico 5 mol/L a 22 °C de 30 min. a 60 min. La duración exacta para la hidrólisis depende del tipo de material.

**A.3.2.3.4** Se lava en agua destilada durante 2 min.

**A.3.2.3.5** Se somete a tinción en reactivo de pararosanilina-Schiff durante 1 h.

**A.3.2.3.6** Se lava tres veces con las soluciones de lavado, siendo cada duración de lavado de 5 min.

**A.3.2.3.7** Se lava 2 veces en agua destilada, siendo la duración de cada lavado de 5 min.

**A.3.2.3.8** Se deshidrata tres veces en etanol, de fracciones de volúmenes 50 %, 70 % y 99 %, siendo la duración de cada deshidratación de 3 min.

**A.3.2.3.9** Se aclara dos veces en xileno, siendo la duración de cada aclarado de 5 min.

**A.3.2.3.10** Se monta la sección en una resina sintética hidrofóbica.

#### **A.3.2.4 Resultados esperados**

Los resultados esperados con el tipo de material recomendado:

Núcleos celulares (DNA) en rojo.

#### **A.4 Identificación inmunohistoquímica de receptores de estrógeno**

Precauciones: El reactivo contiene azida sódica (15 mmol/L). La  $NaN_3$  puede reaccionar con canalizaciones de plomo o cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar el producto, drenar el residuo utilizando un volumen grande de agua.

**A.4.1 Anticuerpo monoclonal murino anti-receptor de estrógeno humano.**

- a) Nombre del producto: Anticuerpo monoclonal murino anti-receptor de estrógeno humano, clon 1D5.
- b) Clon: 1D5.
- c) Inmunógeno: Proteína recombinante del receptor de estrógeno humano.
- d) Origen del anticuerpo: Anticuerpo monoclonal murino suministrado en forma líquida como sobrenadante del cultivo de tejido.
- e) Especificidad: El anticuerpo reacciona con el dominio N-terminal (región A/B) del receptor. En la inmunodifusión, reacciona con la cadena polipeptídica de 67 kDa obtenida por transformación de *Escherichia coli* y transfección de células COS con vectores plasmídicos que expresan el receptor de estrógeno. Además, el anticuerpo reacciona con los extractos citosólicos de endometrio luteal y con la línea celular MCF-7 del cáncer de mama humano.
- f) Reactividad cruzada: El anticuerpo reacciona con receptor de estrógeno de rata.
- g) Composición: Sobrenadante del cultivo de tejido (medio RPMI 1640 conteniendo suero fetal de ternero) dializado frente a una solución tampón Tris que contiene 0,05 mmol/L de Tris /HCl y 15 mmol/L de  $\text{NaN}_3$  ajustada a pH=7,2.
- concentración de Ig: 245 mg/L;
  - isotipo de Ig: IgG1;
  - identidad de la cadena ligera: kappa;
  - concentración total de proteínas: 14,9 g/L.
- h) Manipulación y almacenamiento: Estable durante 3 años después de la fecha de producción si se mantiene a una temperatura de almacenamiento de 2 °C a 8 °C.

**A.4.2 Utilización prevista****A.4.2.1 General**

El anticuerpo se utiliza para la detección cualitativa y semicuantitativa de la expresión del receptor de estrógeno, por ejemplo, en la detección de carcinoma de mama.

**A.4.2.2 Tipo de material**

El anticuerpo puede utilizarse sobre fracciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina, secciones en criostato fijadas en acetona y en frotis celulares. Además el anticuerpo puede utilizarse como un anticuerpo de detección para la técnica inmunoenzimática ELISA.

**A.4.2.3 Procedimiento de tinción para inmunohistoquímica****A.4.2.3.1 General**

Para secciones de tejidos fijadas en formol e incluidas en parafina, son adecuadas una variedad de técnicas sensibles de tinción, incluyendo los procedimientos de la inmunoperoxidasa, la técnica APAAP (fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina) y los métodos con avidina-biotina, tales como los

métodos LSAB (estreptavidina biotina marcada). La recuperación del antígeno, como la efectuada calentando el tampón citrato de concentración 10 mmol/L, pH=6,0, es obligatoria. Los portas no deberían secarse completamente durante este tratamiento ni durante el procedimiento siguiente de tinción inmunohistoquímica. Para la tinción de frotis celulares, se recomienda el método APAAP.

Detalles del procedimiento utilizado por el fabricante en secciones de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina, para verificar la reactividad del anticuerpo en aplicaciones histoquímicas se muestran desde A.4.2.3.2 a A.4.2.3.4.

#### **A.4.2.3.2 Reactivos**

**A.4.2.3.2.1 Peróxido de hidrógeno**, fracción de masa de 3 % en agua destilada.

**A.4.2.3.2.2 Solución tampón Tris (TBS)**, solución que contiene 0,05 mol/L de Tris/HCl y 0,15 mol/L de NaCl, pH=7,6.

**A.4.2.3.2.3 Anticuerpo primario**, Receptor monoclonal murino contra el receptor de estrógenos humanos, diluido óptimamente en TBS (véase A.4.2.3.4).

**A.4.2.3.2.4 Anticuerpos de cabra biotinilado contra inmunoglobulinas de ratón/conejo**, solución de trabajo.

Prepare esta solución 30 min. antes de su utilización pero no 12 h antes de su uso:

- 5 mL de TBS, pH=7,6;

- 50 µL de anticuerpo de cabra biotinilado, aislado por afinidad contra inmunoglobulinas de ratón/conejo añadidos a, solución tampón fosfato que contiene 0,01 mol/L de NaCl y 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>, en cantidad suficiente de solución tampón para alcanzar una concentración final de anticuerpo comprendida entre 10 mg/mL y 20 mg/mL.

**A.4.2.3.2.5 Complejo StreptAB/HRP** (complejo estreptavidina-biotina/peroxidasa de rábano), solución de trabajo:

- 5 mL TBS, pH=7,6.

- 50 µL de estreptavidina (1 mg/L) disueltos en tampón fosfato salino de 0,01 mol/L de NaCl y 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>;

- 50 µL de peroxidasa de rábano biotinilada (0,25 mg/L) disueltos en solución tampón fosfato salino de 0,01 mol/L de NaCl y 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>.

#### **A.4.2.3.2.6 Solución sustrato de diaminobencidina (DAB)**

Se disuelven 6 mg de tetrahidrocloruro 3,3'- diaminobencina en 10 mL de solución tampón TBS de 0,05 mol/L, ajustada a pH=7,6. Se añaden 0,1 mL de solución de peróxido de hidrógeno, fracción de masa de 3 % en agua destilada. Se filtra si se produce un precipitado.

#### **A.4.2.3.2.7 Hematoxilina**

Se disuelve 1 g de hematoxilina, 50 g de sulfato de aluminio y potasio, 0,1 g de yodato de sodio y 1,0 g de ácido cítrico en 750 mL de agua destilada. Se enrasa a 1000 mL con agua destilada.

#### **A.4.2.3.3 Procedimiento de tinción**

**A.4.3.3.1** Se desparafina y rehidratan las secciones de tejido. Se efectúa la recuperación del antígeno (véase los procedimientos de tinción anteriores).

- A.4.2.3.2.2** Se incuban con solución de peróxido de hidrógeno de fracción de masa de 3 % en agua destilada durante 5 min.
- A.4.2.3.2.3** Se lavan con agua destilada y se colocan en TBS durante 5 min.
- A.4.2.3.2.4** Se incuban con el anticuerpo monoclonal al receptor de estrógeno humano, diluido óptimamente en TBS (véase A.4.2.3) durante un tiempo comprendido entre 20 min. y 30 min.
- A.4.2.3.2.5** Se aclaran con TBS y se colocan en un baño de TBS durante 5 min.
- A.4.2.3.2.6** Se incuban con la solución de trabajo de anticuerpo de cabra biotinilado obtenido contra inmunoglobulinas de ratón/conejo, durante un tiempo comprendido entre 20 min. y 30 min.
- A.4.2.3.2.7** Se aclaran con TBS y se colocan en un baño de TBS durante 5 min.
- A.4.2.3.2.8** Se incuban con la solución de trabajo del complejo streptAB/HRP (complejo de estreptovidina biotina/peroxidasa de rábano) durante un tiempo comprendido entre 20 min. y 30 min.
- A.4.2.3.2.9** Se aclaran con TBS y se colocan en un baño de TBS durante 5 min.
- A.4.2.3.2.10** Se incuban con solución de DAB de 5 min. a 15 min. (cuando se manipula la solución de DAB, deberán utilizarse guantes).
- A.4.2.3.2.11** Se lava con agua destilada.
- A.4.2.3.2.12** Se efectúa la contratinción con la solución de hematoxilina durante 30 s.
- A.4.2.3.2.13** Se lavan con agua corriente durante 3 min.
- A.4.2.3.2.14** Se lavan con agua destilada durante 5 min.
- A.4.2.3.2.15** Se deshidratan tres veces en etanol, de fracción de volumen 50 %, 70 % y 99 % respectivamente, siendo la duración de cada deshidratación de 3 min.
- A.4.2.3.2.16** Se aclaran dos veces con xileno, siendo la duración de cada aclarado de 5 min.
- A.4.2.3.2.17** Se montan en una resina sintética hidrofóbica.

#### **A.4.2.3.4 Dilución recomendada**

Puede obtenerse una tinción óptima diluyendo el anticuerpo con TBS, pH=7,6, mezclando ambas soluciones como volúmenes según proporciones respectivas de cada componente comprendidas entre (1 + 50)  $\mu$ L y (1+75)  $\mu$ L, cuando se utilizan para el ensayo de secciones de carcinoma de mama humano fijadas en formol e incluidas en parafina. El anticuerpo puede diluirse en TBS, mezclando como volúmenes según proporciones respectivas de cada componente comprendidas entre (1 + 50)  $\mu$ L y (1+100)  $\mu$ L, para la técnica APAAP y los métodos con avidina –biotina, cuando

se utilizan para el ensayo de secciones en criostato de carcinoma de mama humano, fijadas en acetona.

#### **A.4.2.3.5 Resultados esperados**

El anticuerpo marca fuertemente los núcleos de células que se sabe contienen cantidades abundantes de receptor de estrógeno, por ejemplo, células epiteliales y miometrales del útero y células epiteliales normales e hiperplásicas en glándulas mamarias. La tinción se localiza predominantemente en los núcleos sin colorear al citoplasma. Sin embargo, en las secciones en criostato puede observarse una tinción positiva de receptor de estrógeno tanto en el núcleo como en el citoplasma. Los tejidos que se saben contienen cantidades pequeñas o no detectables de receptor de estrógeno, por ejemplo, epitelio del colon, células del músculo cardíaco, células de los tejidos cerebral y conectivo, dan resultados coherentemente negativos con el anticuerpo. El anticuerpo marca células epiteliales del carcinoma de mama que expresan el receptor de estrógeno.

La tinción de tejidos depende de la manipulación y procesamiento del tejido antes de la tinción. Cualquier procedimiento de fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte de la sección o contaminación con otros tejidos o fluidos, puede producir artefactos o resultados falsos negativos.

### **A.5 Identificación por citometría de flujo de células T humanas**

Precauciones: El reactivo contiene azida sódica (15 mmol/L). La  $\text{NaN}_3$  puede reaccionar con canalizaciones de plomo o cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar el producto, drenar el residuo utilizando un volumen grande de agua.

#### **A.5.1 Anticuerpo monoclonal murino anti-células T humanas**

- a) Nombre del producto: Anticuerpo monoclonal murino anti-células T humanas, CD3.
- b) Clon: UCHT 1.
- c) Inmunógeno: Timocitos humanos de recién nacido y linfocitos obtenidos de un paciente con la enfermedad de Sézary.
- d) Origen del anticuerpo: Anticuerpo monoclonal murino, purificado.
- e) Especificidad: El anticuerpo reacciona con células T del timo, médula ósea, tejido linfático periférico y de la sangre. La mayoría de los neoplasmas de células T expresan también el antígeno CD3, pero este está ausente en tumores malignos linfáticos en los que intervienen células T. De forma compatible con el patrón de síntesis del antígeno en timocitos normales, el lugar de detección más temprana en el interior de células neoplásicas es el citoplasma celular.
- f) Composición:
  - Solución tampón fosfato que contiene 0,05 mol/L de Tris/HCL, 15 mol/L de  $\text{NaN}_3$  y albúmina sérica bovina, fracción de masa de 1 %, pH=7,2.
  - Isotipo Ig: IgG1.
  - Identidad de la cadena ligera: kappa.
  - Concentración total de proteína: 14,9 g/L.
  - Purificación Ig: Columna de separación de sefarosa con la proteína A.

- Pureza: fracción de masa aproximadamente de 95 %.
- Molécula conjugada: Isómero 1 del isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- Relación F/P:  $E_{495 \text{ nm}}/E_{278 \text{ nm}} = 1,0 \pm 0,1$  correspondiente a una relación molar FITC/proteína de aproximadamente 5.

g) Manipulación y almacenamiento: Estable durante 3 años desde la fecha de preparación si se mantiene a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

## **A.5.2 Utilización prevista**

### **A.5.2.1 General**

El anticuerpo está previsto para ser utilizado en citometría de flujo. El anticuerpo puede utilizarse para la detección cualitativa y cuantitativa de células T.

### **A.5.2.2 Tipo(s) de material**

El anticuerpo puede utilizarse para el estudio de suspensiones celulares frescas y fijadas, de secciones en criostato fijadas en acetona y de frotis celulares.

### **A.5.2.3 Detalles del procedimiento utilizado por el fabricante para valorar la reactividad del anticuerpo para las citometrías de flujo**

**A.5.2.3.1** Se recoge sangre venosa en un tubo de ensayo que contiene un anticoagulante.

**A.5.2.3.2** Se aíslan células mononucleares por centrifugación sobre un medio de separación. De forma alternativa, se efectúa en lisado de eritrocitos después de A.5.2.3.4.

**A.5.2.3.3** Se lavan las células mononucleares dos veces con RPMI 1640 o PBS (Solución tampón fosfato de cloruro sódico que contiene  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  de fosfato,  $0,15 \text{ molL}^{-1}$  de NaCl, ajustada a pH=7,4).

**A.5.2.3.4** Se toman 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo monoclonal murino anti-células T humanas, conjugado con FITC y se añade una suspensión celular que contiene  $1 \times 10^6$  (usualmente unos 100 mL) y se mezcla. Se incuba en la oscuridad a 4 °C durante 30 min. [para la tinción doble, el anticuerpo conjugado con RPG (R-ficoeritrina) debería aplicarse al mismo tiempo)].

**A.5.2.3.5** Se lava dos veces con PBS que contiene 2 % de albúmina sérica bovina. Se resuspenden las células en un fluido apropiado para el análisis de citometría de flujo.

**A.5.2.3.6** Se utiliza un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC del mismo isotipo que sea irrelevante como un control negativo.

**A.5.2.3.7** Las células sedimentadas se fijan mezclándose con 0,3 mL de una solución de PBS que contiene paraformaldehído, fracción de masa (contenido) 1 %. Si se almacena en la oscuridad a 4 °C, las células fijadas pueden conservarse hasta 2 semanas.

**A.5.2.4 Dilución recomendada**

El anticuerpo debería utilizarse en forma concentrada para citometría de flujo (10 µL/ensayo). Para utilización con secciones en criostato y frotis celulares, el anticuerpo debería mezclarse con un diluyente adecuado según volúmenes respectivos de  $(1 \pm 50)$  µL.

**A.5.2.5 Resultados esperados**

Interpretación de los resultados: El anticuerpo detecta la molécula CD3 en la superficie de las células T humanas. Cuando se evalúa la tinción de secciones en criostato y frotis celulares, el producto de reacción debería estar localizado en la membrana plasmática.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y procesado del tejido antes de la tinción. Cualquier procedimiento de fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte de la sección o contaminación con otros tejidos o fluidos, puede producir artefactos o resultados falsos negativos.



**Anexo B**  
(informativo)

**Correspondencia entre los términos y definiciones de esta Norma Cubana y  
la NC 376: 2004 Terminología sobre Laboratorios Clínicos y Diagnosticadores**

NC-ISO 19001:2005	NC 376:2004
3.1 información proporcionada por el fabricante	3.2.13 Rotulado Toda información impresa escrita o gráfica o de otro tipo, adherida, o que acompañe a un diagnosticador, incluidas las etiquetas de cualquiera de sus envases o envolturas y la literatura interior.
3.2 etiqueta	3.2.14 Etiqueta Cualquier información impresa, escrita o gráfica colocada sobre un envase.
3.3 reactivo para el diagnóstico in vitro	3.2.1 Diagnosticador Cualquier producto que consista en un reactivo, juego de reactivos, sistema, calibrador, controlador o medio de cultivo, destinado por el fabricante a ser utilizado in vitro en el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano, incluidas las donaciones de sangre y tejidos, con el objetivo de proporcionar información <ul style="list-style-type: none"> <li>- relativa a un estado fisiológico o patológico,</li> <li>- relativa a una anomalía congénita,</li> <li>- para determinar la seguridad y compatibilidad con receptores potenciales,</li> <li>- para supervisar medidas terapéuticas.</li> </ul>
3.7 reactivo cromogénico	3.1.60 Reactivo cromogénico Sustancia que reacciona con determinados grupos químicos formando un compuesto coloreado in situ.
3.9.1 anticuerpo policlonal	3.1.63 Anticuerpo policlonal Mezcla de anticuerpos, proveniente de diferentes clones, capaces de reaccionar específicamente con cierta sustancia inmunogénica.
3.9.2 anticuerpo monoclonal	3.1.62 Anticuerpo monoclonal Anticuerpo producido por un clon, hibridoma o línea celular únicos, capaz de reaccionar específicamente con un único epítipo de una determinada sustancia inmunogénica.

**Bibliografía**

- [1] The Colour Index, 3rd ed. The Society of Dyers and Colourists, Bradford, U.K., 1971.
- [2] Council Directive of 27th June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances (67/548/EEC).
- [3] ECCLS: Dye standards, Part II.5: Pararosaniline (CI 42500) *Histochem J.* (1992) 24, pp 233-235.
- [4] AL SAATI, T., CLAMENS, S., COHEN-KNAFO, E., FAYE, J.C., PRATS, H. and COINDRE, J.M., Production of monoclonal antibodies to human oestrogen receptor protein (ER) using recombinant ER (RER), *Int J Cancer* (1993) 55, pp 651-654.
- [5] BEVERLEY, P.C.L. and CALLARD, R.E., Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody, *Eur J Immunol* (1981) 11, pp 329-34.
- [6] CAMPANA, D., THOMPSON, J.S., AMLLOT, P., BROWN, S. and JANOSSY, G., The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage, *J Immunol* (1987) 138, pp 648-55.
- [7] EC Commission Directive 1976-07-14 76/907/EEC. *Off J Eur Comm* (1996: no L) 360: pp 1-18 and 405-424.
- [8] EC Commission Directive 1983-07-29 83/467/EEC. *Off J Eur Comm* (1983: no L) 257, pp 1-33.
- [9] ERBER, W.N., PINCHING, A.J. and MASON, D.Y., Immunocytochemical detection of T cell and B cell populations in routine blood smears, *Lancet* (1984) 1, pp 1042-5.
- [10] ERBER, W.N., MYNHEER, L.C. and MASON, D.Y., APAAP Labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia, *Lancet* (1986) 1, pp 761-5.
- [11] HOYER, P.E., LYON, H., JAKOBSEN, P. and ANDERSEN, A.P., Standardized Methyl Green-Pyronin Y procedures using pure dyes, *Histochem J* (1986) 18, pp 90-94.
- [12] JAKOBSEN, P., ANDERSEN, A.P. and LYON, H., Preparation and characterization of methyl green tetrafluoroborate, *Histochemistry* (1984) 81, pp 177-179.
- [13] JAKOBSEN, P., LYON, H. and TREPPENDAHL, S., Spectrophotometric characteristics and assay of pure pyronin Y, *Histochemistry* (1984) 81, pp 99-101.
- [14] KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J.R. and CHAMBON, P., Functional domains of the human oestrogen receptor, *Cell* (1987) 51, pp 941-951.
- [15] LAL, R.B., EDISON L.J. and CHUSED TM. Fixation and long-term storage of human lymphocytes for surface marker analysis by flow cytometry, *Cytometry* (1988) 9, pp 213-9.
- [16] SWERDLOW, S.H., ANGERMEIER P.A. and HARTMAN A.L., Intrathymic ontogeny of the T-cell receptor associated CD3 (T3) antigen, *Lab Invest* (1988) 58, pp 421-7.
- [17] NC 376:2004 Terminología sobre Laboratorios Clínicos y Diagnosticadores.