



# **SISTEMA DE DETECCIÓN SELECTIVA DE ANTICUERPOS ANA RELISA®**

**Para uso diagnóstico in vitro**

**Para El Uso Profesional**

**Número de catálogo: 7096-11 (96 pocillos) y 7696-11 (576 pocillos)**

*USO PREVISTO: Se trata de un sistema de inumooanálisis enzimático para la detección de anticuerpos antinucleares en suero humano. Este sistema de análisis ha de emplearse como ayuda en la detección de anticuerpos asociados a las enfermedades reumáticas sistémicas.*

## **RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**

Anticuerpo antinuclear (ANA) es un término general que se emplea para referirse a los autoanticuerpos dirigidos contra diversas proteínas del núcleo celular. En los primeros estudios sobre estos autoanticuerpos, realizados con técnicas de inmunofluorescencia, se observaron determinados detalles de unas pocas proteínas del núcleo (1). A la vista de la elevada correlación entre la presencia de ANA y el lupus eritematoso sistémico (LES), basta con que no estén presentes para descartar la enfermedad (2).

Aunque los anticuerpos específicos del ADN siguen mostrando una elevada correlación con el LES (3), también se han detectado algunas macromoléculas nucleares (4) y citoplásmicas (5-7) asociadas a otras enfermedades del tejido conjuntivo (8-10). Parece que algunos de estos autoanticuerpos tienen un significado diagnóstico y/o pronóstico en la esclerosis sistémica progresiva (11-12), las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (13-15), el síndrome de Sjögren (16-17), la polimiositis (18) y/o la artritis reumatoide (19). Debido a estas asociaciones a enfermedades, en la actualidad se considera que la detección de ANA constituye una herramienta general para la detección selectiva de las enfermedades del tejido conjuntivo (20).

El método más habitual para evaluar los ANA es el método indirecto de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia (IFA) con células cultivadas. La sensibilidad de estas pruebas varía con el tipo de sustrato utilizado, el procedimiento de fijación y los tipos de ANA presentes en los sueros. Se considera que el análisis IFA que emplea células HEP-2 o HEP-2000® es una prueba sensible para la detección de ANA, pero es muy trabajosa y conduce a errores por la variabilidad de los microscopios de fluorescencia y de la interpretación humana.

Los inmunoanálisis enzimáticos (EIA) son una alternativa al método IFA. Los sistemas de análisis EIA pueden hacer una detección selectiva eficaz de grandes cantidades de muestras. Se reducen los errores humanos y los resultados se facilitan de manera objetiva. Sin embargo, se ha informado de que los métodos EIA proporcionan resultados falsos positivos y falsos negativos cuando se comparan con los métodos IFA (21).

## **PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

Se trata de un EIA cualitativo indirecto. La superficie de los micropocillos ha sido recubierta con antígenos estabilizados (ADNbc, histonas, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrómero, PCNA, Ribosomal P, M2 y otros antígenos extraídos del núcleo y el citoplasma de HEP-2), para que actúen como sustrato antigénico en este sistema. Se disponen muestras diluidas de los pacientes en los micropocillos, y se incuban permitiendo que los anticuerpos específicos de la muestra reaccionen con el antígeno de la fase sólida.

Tras lavar para retirar el anticuerpo no ligado y otras proteínas del suero, se incuban los pocillos con anticuerpos humanos de cabra, marcados con peroxidasa de rábano. El preparado de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano que se incluye en sistema de evaluación es específico de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG humana. Tras la incubación con los conjugados de peroxidasa de rábano, y si los resultados son positivos, se forma un complejo estable con tres partes. Dicho complejo está formado por anticuerpo antihumano conjugado con peroxidasa de rábano unido al anticuerpo antinuclear humano, unido a su vez al antígeno estabilizado en la superficie de plástico.

Tras otro paso de lavado se detecta el complejo añadiendo una solución de tetrametilbenzidina (TMB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato cromógeno. El grado de aparición del color en cada pocillo es proporcional a la concentración de anticuerpos antinucleares en cada muestra de suero. Cada micropocillo es analizado en un espectrofotómetro a 450 nm.

## COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

**Conservación:** Todos los componentes deben conservarse en refrigerador a 2-10°C. No congelar.



**Estabilidad:** Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.



### REACTIVOS

**Tiras de micropocillos recubiertas con antígeno RELISA® **PLATE**:** Número de catálogo 7008-11. Contiene un soporte de micropozos con doce tiras de ocho pozos cada una recubierta con antígenos celular (ADNbc, histonas, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrómero, PCNA, Ribosomal P, M2 y otros antígenos extraídos del núcleo y el citoplasma de HEP-2). Estas tiras son de color ciruela. Si se necesitan menos de 8 pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito disecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.

**Disolvente para muestras RELISA® **SOLN|DIL**:** Número de catálogo 7100 (100 ml). Disolvente para muestras tamponado patentado, para disolver las muestras de los pacientes.

**Reactivo enzimático para anticuerpos RELISA® - específico de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG humana **CONJ|HRP**:** Número de catálogo 7009-11 (14 ml). IgG antihumana (L y P), conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Listo para usar.

**Solución de sustrato RELISA® **SOLN|SUB****   : Número de catálogo 7035 (14 ml). Solución de sustrato enzimático específica de HRP, que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Listo para usar. **PELIGRO:** Inflamable. Este reactivo contiene menos de 25% de metanol y acetona. Manténgalo fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico.

**Reactivo de parada RELISA® **SOLN|STOP****   : Número de catálogo 7033 (14 ml). Reactivo de parada patentado para los sistemas de análisis EIA de Immuno Concepts. Listo para usar. **PELIGRO:** Corrosivo. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

**Suero calibrador de ANA RELISA® **CAL**:** Número de catálogo 7026-11 (2 ml). Suero humano que contiene anticuerpos antinucleares. El valor del análisis de este suero figura en la etiqueta del vial. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control positivo de ANA RELISA® **CONTROL|+**:** Número de catálogo 7021-11 (2 ml). Suero de control positivo humano que contiene anticuerpos antinucleares. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control negativo de ANA RELISA® **CONTROL|-**:** Número de catálogo 7031 (2 ml). Suero de control negativo humano que no contiene anticuerpos antinucleares. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control positivo no diluido de ANA opcional RELISA® **OPT+**:** Número de catálogo 7022-11 (0,25 ml). Suero de control positivo humano que contiene anticuerpos antinucleares. Considere este control positivo como suero no diluido.

## ELEMENTOS NO REACTIVOS

### Soporte para micropocillos

#### Solución tampón de lavado:

**Tampón PBS [PWDR|PBS]:** N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Se suministran dos bolsas de polvo tampón con cada placa de 96 micropocillos, en kits de análisis completos).

**Concentrado de tampón de lavado [SOLN|WASH]:** Número de catálogo 1031 (10 ml). Solución de Tween 20 al 5%, para utilizar en el tampón de lavado. (Se suministran dos viales de concentrado de tampón con cada lámina de 96 micropocillos, en kits de análisis completos).

**Preparación:** Disuelva el contenido de una bolsa de polvo tampón en un litro de agua desionizada o destilada. Añada todo el contenido de un frasco de concentrado de tampón de lavado al PBS disuelto. Mezcle bien y conserve a 2-25°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otras alteraciones visibles. La solución tampón de lavado debe estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su empleo.

## OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas de precisión para dispensar volúmenes de 25-1000 µl

Frasco flexible para añadir tampón de lavado a los micropocillos, o un sistema de lavado automático o semiautomático para micropocillos

Envase de un litro para la solución tampón de lavado PBS

Agua desionizada o destilada

Espectrofotómetro de lectura de placas capaz de interpretar absorbancia a 450 nm

Probetas para preparar las diluciones de suero

Papel secante o toallas de papel

Pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos

Guantes desechables

Cronómetro

## PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos aprobados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los materiales del kit deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de paciente deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o con las conducciones de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
6. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.
7. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
8. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
9. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
10. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos. Las muestras deben permanecer en los micropocillos durante el análisis.
11. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
12. Todos los reactivos, micropocillos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

13. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
14. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
15. El reactivo de parada es corrosivo y puede producir quemaduras. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

**Obtención:** La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

**Sustancias que interfieren:** No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados aberrantes. Si la muestra presenta partículas visibles, deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

**Conservación:** Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

**PRECAUCIÓN:** Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

## OBSERVACIONES GENERALES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Es muy importante que todos los componentes del kit y las muestras de suero estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de utilizarlos. Para que un litro entero de tampón de lavado sacado del refrigerador alcance los 20°C, puede ser necesario calentar durante varias horas. Si las temperaturas de incubación son superiores o inferiores a las recomendadas puede que los resultados no sean precisos. Las muestras y reactivos no utilizados deben ser devueltos al refrigerador.
2. Mezcle bien los reactivos antes de utilizarlos, dando la vuelta al envase con suavidad. No agite ni remueva los reactivos. Evite que se forme espuma.
3. Para preparar las diluciones de muestras, limpie la punta de las pipetas antes de utilizarlas para poner suero en el disolvente. Si queda muestra adherida al exterior de la punta de la pipeta, los resultados pueden variar.
4. Se recomienda utilizar una pipeta multicanal porque con ella la dispensación del reactivo y los tiempos de incubación y reacción son más uniformes.
5. **Es extremadamente importante lavar bien los pocillos.** Si no es así, los valores de fondo serán muy elevados, lo que se puede traducir en resultados falsos positivos. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado. Se recomienda utilizar un sistema de lavado automático de los micropocillos, ya que así su limpieza queda garantizada.  
**NOTA:** Como existen diversas técnicas de lavado y de sistemas automáticos, hay que ajustar el número de lavados para que los resultados sea óptimos. Cada laboratorio determinará el número de lavados más eficaz para su sistema de lavado.
6. Si no se elimina todo el tampón puede que la aparición de color no sea homogénea. Para ello, hay que limpiar con fuerza las tiras de micropocillos, secándolas con papel secante o toallas absorbentes.
7. El tiempo de cada paso es fundamental. Antes de iniciar el procedimiento se disolverán las muestras de suero, que deben ser dispuestas en los micropocillos en el menor tiempo posible (no más de cinco minutos). Los tamaños de lote deben determinarse de forma que se puedan manipular las muestras en este período de tiempo con comodidad. Se recomienda utilizar pipetas multicanal, pues facilitan la manipulación de las muestras y los reactivos.
8. A excepción de la última incubación (solución de sustrato), cada período de incubación empieza al finalizar la dispensación de la muestra o el reactivo. La incubación de la solución de sustrato debe durar exactamente 30 minutos para cada pocillo. Todas las muestras y reactivos deben dispensarse con la misma secuencia y a velocidad constante.

# INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

## CÁLCULOS

1. Reste el valor de la absorbancia del pocillo sin reactivo, de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de calibración, control y muestra del paciente. Calcule los valores medios de la absorbancia en pocillos duplicados.
2. Para obtener el factor de conversión, se divide la concentración de anticuerpos específicos del suero de calibración (que figura en la etiqueta) por el valor medio de la absorbancia medida en los pocillos de calibración.
3. Para obtener la concentración de anticuerpo específico en unidades, se multiplican los valores de la absorbancia de cada muestra por el factor de conversión.
4. Este cálculo se puede expresar de forma simplificada como:

$$\frac{U_c}{\lambda_c} \times \lambda_s = U_s$$

$U_c$  = Valor del calibrador (unidades)

$\lambda_c$  = Absorbancia del calibrador\*

$\lambda_s$  = Absorbancia de la muestra\*

$U_s$  = Valor de la muestra en unidades

\*Si se analizan los calibradores y las muestras por duplicado, utilice la absorbancia promedio de los pocillos duplicados.

## CONTROL DE CALIDAD

1. El valor medio de la absorbancia de los pocillos de calibración debe ser de 0,400 como mínimo. Si es inferior, la aparición del color no es adecuada y el ciclo no es válido. Si la aparición del color no es adecuada suele deberse a que los reactivos están fríos o a que la duración de uno o más pasos de la prueba no ha sido correcta. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) y repita el ciclo prestando especial atención a la duración de todos los pasos.
2. El pocillo de control vacío debe presentar un valor de absorbancia inferior a 0,150. Si los valores de absorbancia en el pocillo vacío son superiores a 0,150, ello indica que el lavado no ha sido adecuado o que se han contaminado los reactivos.
3. Las muestras que presentan valores específicos de anticuerpos por encima del límite superior del calibrador deberán ser reportadas como positivas con un valor "mayor a o igual al" valor estipulado en la etiqueta del calibrador.
4. Es necesario calcular el factor de conversión en cada ciclo. Si se emplea el factor de conversión de otro ciclo, los resultados no serán válidos.
5. Cada laboratorio deberá establecer y mantener sus propios rangos de referencia (normal), en función de la población de pacientes y de otros factores locales.
6. El suero de control positivo es un suero humano que contiene anticuerpos antinucleares. Se trata de un control cualitativo que debe dar un valor superior a 15 unidades ANA.
7. El suero de control negativo es una mezcla de sueros humanos que no contienen anticuerpos antinucleares. Este control debe dar valores inferiores a 10 unidades ANA.
8. El suero de control positivo sin diluir es un suero humano que contiene anticuerpos antinucleares. Este control debe dar un valor de más de 15 unidades ANA.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

Se trata de un análisis cualitativo. Los niveles de anticuerpos detectados carecen de significado clínico, y las cifras obtenidas en unidades sólo sirven para separar a los pacientes en los siguientes tres grandes grupos. Los pocillos con muestras de pacientes que presentan valores calculados superiores o iguales a 15 unidades ANA, se consideran positivos y deben ser evaluados con una placa de HEp-2 o HEp-2000<sup>®</sup> para determinar los patrones de tinción de los ANA, y hacer la oportuna evaluación de seguimiento. Los pocillos con muestras de pacientes que presentan valores calculados inferiores a 10 unidades ANA se consideran negativos. Los valores entre 10 y 15 unidades se consideran positivos en el límite y deben repetirse, o deben ser evaluados con una placa de HEp-2 o HEp-2000<sup>®</sup> para determinar los patrones de tinción de los ANA, y hacer la oportuna evaluación de seguimiento. Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites de referencia y valores de corte, en función de la población de pacientes evaluada. Los valores resultan afectados por factores de los pacientes, consideraciones mecánicas (como la exactitud y precisión del pipeteado) y las condiciones del análisis (como la temperatura y la cronología de los pasos).

## NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS

Se indicará si el resultado es positivo o negativo para los anticuerpos antinucleares. Los niveles de anticuerpos carecen de significado clínico conocido.



## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos antinucleares. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos antinucleares. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Determinados fármacos, como procainamida e hidralazina, pueden inducir un trastorno similar al lupus eritematoso (22). Los pacientes con LE inducido por fármacos pueden dar ANA positivos.
4. Aunque una titulación elevada de ANA puede ser muy sugerente de enfermedad del tejido conjuntivo, no debe considerarse diagnóstica, sino parte de la historia clínica general de un paciente.
5. También se observan ANA en un pequeño porcentaje de pacientes con enfermedades infecciosas y/o neoplásicas (9).

## VALORES ESPERADOS

La incidencia de autoanticuerpos contra los diversos antígenos nucleares varían en función de la población de pacientes y de la incidencia de enfermedades reumáticas clínicas en esa población. Aplicando la técnica de inmunofluorescencia indirecta a células HEp-2, se han detectado anticuerpos antinucleares en el 95% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico, en el 90% de los pacientes con lupus inducido por fármacos, en el 95% de los pacientes con enfermedades mixtas del tejido conjuntivo, en el 80% de los pacientes con síndrome de Sjögren y en el 90% de los pacientes con esclerodermia (23).

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se ha comparado sistema de detección selectiva de ANA RELISA® de Immuno Concepts con otro kit de detección de anticuerpos antinucleares ELISA comercializado. La población estudiada consistió en 579 muestras enviadas a un gran centro médico universitario para el análisis de anticuerpos nucleares; se sabía que 90 muestras eran positivas para ANA, que 242 procedían de donantes de sangre de sexo femenino y 261 de sexo masculino. Todas las muestras fueron evaluadas en paralelo con el dispositivo sujeto y el dispositivo predicado. Según esta comparación, se obtuvieron los siguientes datos:

IC evaluación de anticuerpos antinucleares RELISA®	Dispositivo predicato	
	Positivo	Negativo
Positivo	214	46
Limite	12	105
Negativo	8	787

Los resultados en el límite se consideraron positivos. Estos datos muestran una coincidencia general del 85,4%.

El elevado número de muestras “falsas positivas” observado con la prueba de Immuno Concepts resultaba preocupante, así que buscamos anticuerpos antinucleares en todos los sueros con el sistema de análisis de ANA-Ro HEp-2000® de Immuno Concepts. Se demostró que 79 de los “falsos positivos” presentaban patrones de ANA claramente discernibles con la técnica indirecta de inmunofluorescencia, y fueron considerados “positivos auténticos” para la detección de anticuerpos antinucleares. Se demostró que 4 de los “falsos negativos” daban negativo con la técnica indirecta de inmunofluorescencia, y fueron considerados “negativos auténticos” para la detección de anticuerpos antinucleares. Por eso, si se tiene en cuenta el método de referencia, la comparación tiene este aspecto:

IC evaluación de anticuerpos Antinucleares RELISA®	Método de referencia	
	Positivo	Negativo
Positivo	305	72
Negativo	4	791

Estos datos muestran una coincidencia general del 93,5%.

## REPRODUCIBILIDAD

Nueve muestras positivas, dos en el límite y cinco negativas fueron analizadas con tres números de lote diferentes de tiras de micropocillos recubiertas con antígeno, en varias ocasiones y por diferentes técnicos. En ningún caso hubo una muestra negativa que diera positivo, y las positivas lo siguieron siendo claramente. Algunas muestras en el límite variaron entre negativo y en el límite.

# BIBLIOGRAFICI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleo-protein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease—An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Emlen, W., O'Neill, L. Clinical Significance of Antinuclear Antibodies (ANA): Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assays. Arthritis Rheum. 40:1612-1618, 1997.
22. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
23. von Mühlen, C.A., Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Semin. Arthritis Rheum. 24:323-358, 1995.

**En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.**



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
 Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

# PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ANA RELISA®

Todas las muestras (incluida la solución tampón de lavado) y los micropocillos deben estar a temperatura ambiente antes de su empleo.

- 1. PREPARACIÓN DE LA HOJA DE TRABAJO**

Marque la hoja de trabajo que se adjunta con el kit, para indicar la localización de las muestras en los micropocillos. Analice el calibrador por duplicado. Un pocillo debe quedar libre de reactivo. Recomendamos que todas las muestras de pacientes y de control se analicen por duplicado hasta que se alcance una precisión aceptable en su laboratorio.
- 2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN TAMPÓN DE LAVADO (PBS-Tween)**

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón PBS en un litro de agua desionizada o destilada. Añada todo el contenido de un frasco de concentrado de tampón de lavado al envase de un litro de PBS disuelto. Mezcle bien. La solución tampón de lavado se puede tapar y conservar a 2-25°C durante cuatro semanas como máximo.
- 3. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES**

Disuelva las muestras de pacientes a 1:40 añadiendo 25 µl de suero a 975 µl de disolvente de muestras. Si utiliza el control positivo analizado no diluido de ANA opcional, deberá disolverlo igual que las muestras de los pacientes. Mezcle bien. Los controles positivos y negativos y el calibrador se entregan a la dilución de trabajo, por lo que no es necesario disolverlos.
- 4. PREPARACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS**

Saque de la bolsa el número requerido de tiras de micropocillos y coloquelos en el soporte provisto. Los micropocillos deben quedar firmemente sujetos en el soporte. Precione firmemente ambos lados de cada tira de forma que encajen bien dentro del soporte. Si emplean pocillos individuales o menos de una tira completa de pocillos asegúrese de que queden bien encajados. Los pocillos que están bien encajados no se caerán si voltea el soporte al revés. Si se necesitan menos de ocho pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito desecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.
- 5. DISPENSACIÓN DE LAS DILUCIONES DE SUERO**

Ponga 100 µl del calibrador, los controles y las muestras de pacientes en los pocillos correspondientes, como se describe en la hoja de trabajo. Ponga 100 µl de disolvente de muestras en el pocillo que no lleva reactivo.
- 6. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea se pueden tapar las tiras con cinta transparente o con toallas de papel, para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.
- 7. LAVADO DE LAS TIRAS (véanse las Observaciones generales sobre el procedimiento 5 y 6)**

Lave los pocillos de 3 a 5 veces con solución tampón de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.
- 8. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO CON ANTICUERPOS ENZIMÁTICOS**

Ponga 100 µl de reactivo con anticuerpos enzimáticos en cada pocillo.
- 9. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea se pueden tapar las tiras con cinta transparente o con toallas de papel, para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.
- 10. LAVADO DE LAS TIRAS**

Lave los pocillos de 3 a 5 veces con solución tampón de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.
- 11. DISPENSACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUSTRATO**

Utilizando un cronómetro para que los intervalos sean homogéneos, ponga 100 µl de solución de sustrato en cada pocillo. La solución de sustrato se incorporará a los pocillos a velocidad constante, de forma que todos se sometan al mismo tiempo de incubación (30 minutos). La solución de sustrato incubada en los pocillos con muestras positivas se volverá de color azul, y si son muestras negativas, serán incoloras o de azul muy claro.
- 12. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos exactamente a temperatura ambiente, es decir, 18-25°C)**

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos exactamente. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos.
- 13. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO DE PARADA**

Cuando el primer pocillo haya sido incubado durante 30 minutos exactos, añada 100 µl de reactivo de parada a cada pocillo, en el mismo orden y a la misma velocidad en que se añadió la solución de sustrato a los pocillos. Tras añadir el reactivo de parada, la solución de sustrato azul se volverá amarilla y la incolora permanecerá tal cual.
- 14. INTERPRETACIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LOS POCILLOS**

En los treinta minutos siguientes a la adición del reactivo de parada, los pocillos deben ser medidos en un espectrofotómetro de lectura de placas. Los pocillos se medirán a 450 nm, frente al pocillo sin reactivo. Si se dispone de un espectrofotómetro con doble longitud de onda, la del filtro de referencia debe ser de 600-650 nm. Si se leen los micropocillos a 450 nm sin filtro de referencia, los valores de la absorbancia serán más elevados.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

