



ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES HEp-2 (ANA-HEp-2)



COD 44108 24 determinaciones	COD 44508 60 determinaciones	COD 44509 120 determinaciones
COD 44546 10 x 6 determinaciones	COD 44547 10 x 12 determinaciones	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-nucleares Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico		

ANTICUERPOS ANTI-NUCLEARES HEp-2 (ANA- HEp-2)

Inmunofluorescencia Indirecta
CÉLULAS HEp-2

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en las células HEp-2. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

	COD 44108	COD 44508	COD 44509
A. Portaobjetos	4 x 6 det.	10 x 6 det.	10 x 12 det.
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Cont. Posit. ANA- Ho	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 mL	1 x 3 mL	2 x 3 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 4	1 x 10	1 x 10

	COD 44546	COD 44547
A. Portaobjetos	10 x 6 det.	10 x 12 det.

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Células HEp2 cultivadas en cada pocillo.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Control Positivo ANA-Ho:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón homogéneo, azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante.**

Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en el cultivo de células.

REACTIVOS AUXILIARES

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans,** conjugado con contratinción de azul de Evans.
- E. Mounting Medium.** Medio de Montaje.
- C+. Control Positivo ANA-Ho.**
- C+. Control Positivo ANA-Sp:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón moteado, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Nu:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón nucleolar, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Ce:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón centrómero, azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo.**

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/80 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/160.

Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

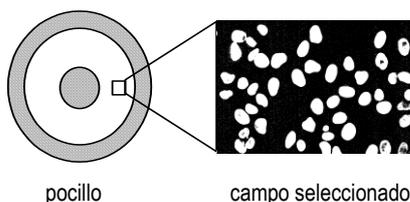
PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (25 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.

7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
8. Depositar una gota de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar las células con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo. Seleccionar campos con distribución de células e intensidad de fluorescencia uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada.

ANA: Existen diferentes patrones de fluorescencia nucleares y citoplasmáticos que son considerados como un resultado positivo para la prueba. Distintos patrones pueden coexistir en un mismo suero e incluso modificarse con la dilución del mismo. Los principales patrones anti-nucleares se describen a continuación, siguiendo la nomenclatura del ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Nuclear homogéneo: Fluorescencia homogénea y regular a través de todo el nucleoplasma, los nucléolos pueden o no fluorecer dependiendo del sustrato celular. Las células en mitosis (metafase, anáfase y telófase) tienen la cromatina intensamente fluorescente de manera homogénea.

AC-3 Centrómico: Granular grueso discreto (40 – 80/célula) dispersos en los núcleos de las células en interfase y alineados en la masa de la cromatina en las células mitóticas. Por ejemplo anti-CENP-B

AC-4 Nuclear granular fino: Gránulos diminutos finos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metafase, anafase y telófase) tienen la masa de la cromatina no teñida. Por ejemplo anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La

AC-5 Nuclear granular grueso/grande: Gránulos gruesos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metafase, anafase y telófase) tienen la masa de la cromatina no teñida. por ejemplo anti-Sm, anti-U1 RNP

AC-8 Nucleolar homogéneo: Fluorescencia difusa en todo el nucléolo, mientras que la placa metafásica no muestra tinción. Ej. Anti-PM-Scl, anti Th/To.

AC-9 Nucleolar grueso: Tinción irregular del nucléolo y cuerpos de Cajal, con tinción peri-cromosomal en las placas metafásicas. Ej. anti-fibrilarina.

AC-21 Citoplasmático reticular /AAM: Tinción de filamentos granulares gruesos que se extienden a través del citoplasma. Ej. anticuerpos anti-mitocondriale

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cuando no se observa ninguno de los marcajes específicos descritos, el resultado es negativo para los autoanticuerpos indicados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (C+) y el Control Negativo (C-) suministrados con los kits cod 44108, cod 44508 y cod 44509 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo no debe proporcionar marcaje específico alguno.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

El conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo ANA-Ho está verificada frente al suero de referencia AF/CDC1 de los *Centers for Disease Control*.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: La determinación de anticuerpos anti-nucleares tiene una sensibilidad superior al 95% para el lupus eritematoso sistémico, y una baja especificidad³.

- **Nuclear homogéneo (AC-1):** Indicativo de lupus eritematoso sistémico.
- **Nuclear granular (AC-4, AC-5):** Asociado al lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, polimiositis o escleroderma.
- **Nucleolar (AC-8, AC-9):** En aproximadamente un 50-70% de pacientes con solapamiento de escleroderma y polimiositis/dermatomiositis. Se presenta en hasta un 33% de pacientes con escleroderma sistémica, especialmente con complicaciones renales³.
- **Centrómico (AC-3):** En pacientes con esclerosis sistémica, especialmente en la forma de la enfermedad con implicación cutánea (80%). Ocasionalmente, en otras enfermedades conectivas⁴.
- **Mitochondrial (AC-21):** Común en cirrosis biliar primaria, esclerosis generalizada y raro en otras enfermedades autoinmunes sistémicas.

El kit BioSystems anticuerpos anti-nucleares fue usado para determinar 140 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, escleroderma, síndrome de CREST, dermatopolimiositis, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune y cirrosis biliar primaria), así como donantes sanos. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad diagnóstica para el conjunto de enfermedades autoinmunes del 98,3% y 93%, respectivamente.

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Franciscantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.