



## FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) presentes en el suero se unen a los antígenos adsorbidos a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido y la formación de producto amarillo se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción<sup>1</sup>.

## CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado. 50 mL. Tampón fosfatos, azida de sodio 15 mmol/L.
- B. Diluyente de Muestra. 100 mL. Tampón Tris, azida de sodio 15 mmol/L.
- C+. Control Positivo. 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-nucleares específicos, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo. 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos anti-nucleares específicos, azida de sodio 15 mmol/L.
- CO. Patrón de Valor Discriminante. 1,5 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-nucleares, azida de sodio 15 mmol/L.
- D. Conjugado. 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa.
- E. Sustrato. 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro. 15 mL. Ácido fosfórico 4,5%.

**PELIGRO: H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.**

- M. Microplaca: 12 módulos de 8 pocillos sensibilizados con una mezcla de antígenos SSA 52, SSA 60, SSB (La), Sm/RNP, RNP-70, RNP-A, RNP-C, SmBB<sup>1</sup>, Smd, SmE, SmF, SmG, Scl70, Jo1, dsDNA, ssDNA, polinucleosomas, mononucleosomas, histona H1, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, PMScl-100 y centrómero B.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

*Los sueros humanos utilizados en la preparación del control positivo, el control negativo 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 componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de lavado. Efectuar una dilución 1/20 del Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada y mezclar. Se necesitan aproximadamente 50 mL de Tampón de Lavado para el lavado de una tira. Una vez diluido, el reactivo es estable 30 días a 2-8°C.

Los demás componentes están listos para su uso.

## EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda.
- Aspirador multicanal o lavador automático de microplacas.
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta y filtro de 450 ± 10 nm.

## MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Diluir las muestras 1/100 con Diluyente de Muestra antes del ensayo. Utilizar siempre diluciones frescas.

## PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
3. Pipetear 100 µL de Control Positivo (C+), Control Negativo (C-), Patrón de Valor Discriminante (CO) y muestras diluidas en distintos pocillos.
4. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido y lavar los pocillos con 300 µL de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 3 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (Nota 5).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm. El color es estable durante al menos 30 minutos.

## CÁLCULOS

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de absorbancia} = \frac{A_{450\text{nm}} \text{ de la Muestra}}{A_{450\text{nm}} \text{ del Valor Discriminante}}$$

Cuando se obtengan valores de absorbancia por encima del límite superior del rango del lector de microplacas, diluir la muestra con Diluyente de Muestra y repetir la operación.

## VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con razón de absorbancia superior a 1,2.

Se consideran negativas las muestras con razón de absorbancia inferior a 1,0.

Las muestras con razones comprendidas entre 1,0 y 1,2 deben considerarse dudosas y se recomienda la repetición del ensayo o la determinación de parámetros alternativos de valor diagnóstico.

Estos valores se dan únicamente a título informativo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

## CONTROL DE CALIDAD

La absorbancia del Control Positivo debe ser superior a 0,600, la del Control Negativo inferior a 0,300 y la del Patrón de Valor Discriminante debe ser superior a 0,300, para cada especificidad.

La razón de absorbancia para el Control Negativo (C-) debe ser inferior a 1,0.

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

- Especificidad: Los sueros de referencia "ANA Human Reference Sera" AF/CDC-1, AF/CDC-2, AF/CDC-4, AF/CDC-5, AF/CDC-7, AF/CDC-8, AF/CDC-9, AF/CDC-10, del Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA, muestran resultados positivos.
- Interferencias: La hemólisis (hemoglobina < 1000 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 3000 mg/dL) y la bilirrubina (< 40 mg/dL) no interfieren. Tampoco se han observado interferencias debidas al uso de anticoagulantes. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir<sup>2</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La sensibilidad de la determinación de anticuerpos anti-nucleares es superior al 95% para Lupus Eritematoso Sistémico, aunque la especificidad es bastante baja<sup>3</sup>. La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-nucleares (ANA) también es indicativa de otras enfermedades reumáticas sistémicas como lupus eritematoso sistémico inducido por drogas, síndrome de Sjögren, escleroderma y variantes, polimiositis y dermatomiositis, síndrome CREST, enfermedad mixta del tejido conectivo y artritis reumatoide<sup>3</sup>.

La sensibilidad y la especificidad para el grupo de enfermedades formado por lupus eritematoso sistémico, escleroderma, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren primario, polidermatomiositis y CREST del kit de Anticuerpos ANA Screening de BioSystems fue del 98,9% y 97,9%, respectivamente, en un estudio con 242 muestras clínicas. Los detalles del estudio están disponibles bajo solicitud.

Es recomendable que aquellos sueros que sean positivos para el kit ANA screening sean comprobados con kits específicos para conocer su especificidad.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta únicamente el resultado de estos ensayos, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## NOTAS

1. No mezclar componentes de distintos lotes de kit.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
3. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
4. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
5. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el Sustrato (E) en el paso 9.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCPress, 2000.
3. Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.