

RESUMEN Y APLICACIÓN

Los anticuerpos antinucleares (AAN) se encuentran frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso. (LET) y comúnmente en otras enfermedades auto inmunes Artritis reumatoide, enfermedades del colágeno vascular, enfermedades hepáticas crónicas, esclerosis sistémica (esclerodermia) los ANA se asocian con varios antígenos nucleares incluidos dsDNA, SSDNA, RPN, Sm, SSA.

Los ANA frecuentemente se incrementan en edades y personas aparentemente sanas que rebasan los 45 años de edad sobre todo en mujeres.

El ensayo de escrutinio de la detección de ANA se usa para el diagnóstico de diferentes enfermedades auto-inmunes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es añadido a los pozos cubiertos con antígeno purificado, el anticuerpo específico IgG se encuentra presente atándose al antígeno todo aquel material que no se haya unido será lavado y desechado, la enzima conjugada será añadida para formar el complejo antígeno anticuerpo. El exceso de la enzima conjugada es lavado y se añade el sustrato, el plato se incuba y se deja hasta que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato con la enzima. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos en la muestra.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacene el equipo entre 2° - 8°C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica. No exponer los reactivos a la luz del sol directa o a la luz durante el periodo de almacenaje.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con anti Ana	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador amarillo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
5. Control Negativo azul: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales potencialmente biopeligrosos.
El suero y los calibradores son de origen humano han sido probados no reaccionaron para hepatitis B antígeno de superficie también para anticuerpo HIV. Aprobados por la FDA. Sin embargo estos métodos pueden no estar completamente garantizados para virus de hepatitis B HIV y otros agentes infecciosos ausentes, estos reactivos deben ser tratados con un nivel de bioseguridad nivel 2, recomendado por el centro de control nacional de enfermedades y en el manual para instituciones de salud bioseguridad microbiológica y laboratorios biomédicos 1984.
2. Para la obtención de mejores resultados se debe apegar estrictamente a este protocolo, en la precisión de pipeteo, el tiempo y temperatura indicadas son requerimientos esenciales.
3. No pipetear con la boca, no fumar, comer o beber en las áreas en donde los reactivos y muestras son manipulados.
4. Los componentes de este equipo deben ser utilizados en forma de unidad integral los reactivos de diferente lotes no deben ser mezclados.
5. El control tiene un conservador de acida de sodio, la acida de sodio puede ser muy reactivo en contacto con el cobre, plomo o explosivo en contacto con el metal.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolectar 1 muestra de sangre y separarla del suero.
2. La muestra puede ser refrigerada entre 2°- 8°C por un período de 7 días o congelar por un periodo de 6 meses.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Traer todas las muestras y reactivos para llevarlos a la temperatura ambiente (20 – 25°C) y mezclar gentilmente
2. Preparar solución buffer a 1X agregando el contenido de la botella de 25 ml que está a 20X y llevarlos a 475 ml de agua desionizada.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Favor de cortar el número de tiras deseada
2. El control negativo y positivo así como el calibrador están listos para usarse. Preparar una disolución de las muestras 1:21 agregando 10 µl de la muestra a 200 µl de diluyente de la muestra.
3. Dispensar 100 µl de suero diluyente, calibrador y controles dentro de los pozos adecuados para el reactivo blanco, dispensar 100 µl de muestra diluyente en la posición 1ª del micro lector, golpear levemente el pozo para remover las burbujas que se encuentran mezcladas con la solución, incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Remover el líquido de los pozos, repetir el tiempo de lavado por tres veces con la solución buffer
5. Agregar 100 µl de la enzima conjugada a cada pozo, incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Remover la enzima conjugada de los pozos, repetir el tiempo de lavado en tres tiempos con la solución buffer.
7. Agregar 100 µl de TMB solución sustrato e incubarlo por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregar 100 µl de solución paro
9. Leer O.D. estable durante 15 minutos a 450nm usando un micro lector. En lectores duales se recomienda la referencia entre 600-650 nm.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Checar el factor de calibración (CF) valorado en la botella del frasco, este valor puede ser que varíe de lote a lote marque y cheque con seguridad en cada equipo.
2. Calcular el punto de corte valuado. Calibrador el OD del calibrador por el factor de calibración.
3. Calcular el anticuerpo catalogado (índex) por cada determinación, por división del OD. Valuado por cada punto de corte de la muestra valuada.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Calibrador OD = 0.8

Factor de calibración = 0.5

Punto de corte valuado = $0.8 \times 0.5 = 0.400$

Control positivo OD = 1.2

Anticuerpo (Índex) = $1.2/0.4 = 3$

Muestra del paciente OD = 1.6

Anticuerpo (Index) $1.6/0.4 = 4.0$

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse valida siempre que si siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD del calibrador debe considerarse por arriba de 0.250
2. El Anticuerpo (índex) para control negativo debe ser por debajo de 0.9
3. El anticuerpo (índex) para control positivo debe ser superior al 1.2

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente está planeado como guía para la interpretación de los resultados de ANA por IgG, cada laboratorio se encargará de establecer un criterio para la interpretación de los resultados de ANA por IgG, cada laboratorio se encargará de establecer un criterio para la interpretación basándose en las muestras populares encontradas.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

<0.9 anticuerpo no detectado de Anti ANA por ELISA.

0.9-1.1 sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 anticuerpo detectado de Anti ANA por Elisa.

LIMITANTES DE LA PRUEBA

Los resultados obtenidos en el ensayo de Anti ANA solo sirven como auxiliar en el diagnóstico de la enfermedad y solo debe ser interpretada en relación con el historial clínico y físico del paciente y corroborado con otro método de diagnóstico. Las muestras hemolizadas o lipemias pueden causar error.

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad

354 sueros de pacientes fueron probados con Anti ANA ELISA en IgG 148 sueros fueron positivos y 188 sueros negativos por combinación de métodos (95% acordado) arrojaron los siguientes resultados.

Referencia Equipo De Elisa	Anticuerpo Anti ANA			total
	+	+/-	-	
+	148	6	4	158
+/-	2	0	0	2
-	6	0	188	194
Total	156	6	214	354

2. Precisión

Ensayos Intra estudio

Suero	No Réplicas	Supuestos	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
1	16	1.41	0.06	4.22
2	16	0.82	0.02	2.6
3	16	0.29	0.03	9.48

REFERENCIAS

1. Wong KH Lawton JW Cheng SK; Lee SS, Lau Cs Measurement of anti-dsDNA
2. Bootama H. Spronk Pe; ter borg EJ; Hummel Ej, de Boer G. Limburg Pc.
3. Takeuchi Y. Ishikawa O, Miyachi Y the Comparative study of anti-double stranded DNA antibody levels measured by radio immunoassay and ELISA.
4. Batinić D; Dožićević M; krstulović D; sentić M, Markeljević J malenica B, Cike N.
5. Tomer y viegas OA, Swissa M, Koh SC Shoenfield