

USO PREVISTO

El sistema de prueba IFA ANA HEp-2 de ZEUS es un ensayo previamente estandarizado que está diseñado para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos antinucleares. La prueba está diseñada para ayudar a determinar el lupus eritematoso sistémico (LES) y para diferenciar trastornos del tejido conectivo que son clínicamente similares. Esta prueba es para uso diagnóstico in vitro.

IMPORTANCIA Y ANTECEDENTES

El método técnico de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos (IFA) ha sido ampliamente utilizado para detectar la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en el suero de pacientes que padecen lupus eritematoso sistémico (LES) y otros trastornos del tejido conectivo clínicamente similares (1 - 5). Asimismo, los ANA pueden estar asociados a numerosos síndromes de lupus inducidos por fármacos (6 - 7), que imitan clínicamente la forma espontánea del LES. Varios investigadores (8 - 9) han adaptado la técnica IFA para las pruebas de ANA siguiendo los métodos básicos originalmente descritos por Coons (10). Los ANA están compuestos principalmente por anticuerpos IgG; sin embargo, también pueden detectarse ANA compuestos por IgA e IgM (11). Ahora se reconoce que pueden emplearse muchas fuentes de material nuclear como sustrato para las pruebas de ANA. Aunque la mayoría de la investigación original sobre ANA se realizó utilizando sustratos de sección de hígado o riñón de rata o ratón, el uso de sustratos de cultivos celulares de tejido embrionario animal o humano ha proporcionado un sustrato alternativo confiable y fácil de interpretar para las pruebas de ANA. La línea celular HEp-2 es un sustrato recomendado para detectar anticuerpos centrómeros, cuya presencia es altamente indicativa de la variante CREST de la esclerosis sistémica progresiva (27). Hay numerosos patrones diferentes de inmunofluorescencia nuclear y citoplasmática. Los distintos patrones y su base son los siguientes:

Homogéneo: Los patrones homogéneos o difusos de tinción del núcleo se corresponden con autoanticuerpos frente a histonas del ADN nativo (ADNn) y/o desoxirribonucleoproteínas (DNP) (12, 13). Los cromosomas de las células mitóticas (las células que se dividen) son indicadores importantes de un patrón homogéneo porque se teñirán como masas de forma irregular con bordes externos más intensamente teñidos.

Patrones moteados: El patrón moteado es el patrón de ANA más comúnmente observado. Un patrón uniforme “verdaderamente moteado” se puede observar con anticuerpos centrómeros en células que no se están dividiendo. Un patrón moteado granulado se puede observar con anticuerpos frente a RNP-n, Sm y SSB/La.

1. **Patrón de moteado fino, negativo para cromosomas:** Numerosos puntos de fluorescencia pequeños y uniformes, esparcidos de manera uniforme por todo el núcleo. Los nucléolos aparecen generalmente sin tinción. Las células mitóticas pueden mostrar unas pocas motas en su citoplasma, pero los cromosomas serán negativos.
2. **Patrón de moteado grueso, negativo para cromosomas:** Puntos de fluorescencia de tamaño mediano que estarán esparcidos por todo el núcleo con márgenes nucleares manifiestos. También se pueden observar puntos de fluorescencia de tamaño grande; sin embargo son demasiado numerosos y variables en tamaño como para ser identificados como un patrón nucleolar. Los cromosomas en las células mitóticas serán negativos.
3. **Moteado separado, positivo para cromosomas (especificidad centromérica):** Los cromosomas serán positivos en células mitóticas; de hecho, el moteado separado solo estará agrupado en la masa de cromosomas demostrando claramente las diversas fases de mitosis. Se ha reconocido que el patrón centromérico está asociado con el síndrome de CREST, que es una variante más leve de la esclerosis sistémica progresiva (ESP). El patrón centromérico mostrará puntos de fluorescencia separados y uniformes, esparcidos por todo el núcleo. Las células mitóticas serán positivas, y mostrarán un agrupamiento de los centrómeros en los cromosomas en diferentes disposiciones de acuerdo con el estado mitótico. Harmon, et al (17) demostraron que las muestras de suero que contenían anticuerpos altamente monoespecíficos anti-SSA/Ro presentaban un patrón de prueba de IF para ANA de motas nucleares separadas en una amplia variedad de células humanas y núcleos tumorales. Estas muestras de suero con anticuerpos monoespecíficos anti-SSA/Ro produjeron muy poca tinción citoplasmática de las células del sustrato. Se ha descrito un patrón moteado manifiesto, grande y variable de 3 a 10 motas grandes en el núcleo. Estos pacientes con motas grandes, variables tienen síndromes de enfermedad reumática indiferenciada con anticuerpos IgM antihistona H-3 (18).

Patrón nucleolar: El patrón nucleolar muestra una tinción homogénea o moteada de los nucléolos. Este patrón a menudo se asocia con una fluorescencia difusa, homogénea en el resto del núcleo. Los cromosomas en las células mitóticas serán negativos. El patrón nucleolar sugiere autoanticuerpos frente a ARN 4 - 6S. La fluorescencia nucleolar aparecerá como homogénea, agrupada o moteada, según el antígeno frente al que reaccione el autoanticuerpo. Los anticuerpos antinucleolares se dan principalmente en el suero de pacientes con escleroderma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o el fenómeno de Raynaud (19).

Periférico (en anillo): La tinción de los núcleos sucede predominantemente en su periferia. Los cromosomas de las células mitóticas se tiñen como masas de forma irregular con bordes externos teñidos más intensamente. Este patrón se ve a menudo con autoanticuerpos frente a ADNn (3, 14 - 16). Si los cromosomas de las células mitóticas son negativos, entonces el patrón sugeriría autoanticuerpos frente a la membrana nuclear y no frente al ADNn y no se informa como patrón periférico (véase la interpretación de la membrana nuclear a continuación).

Patrones adicionales:

1. **Patrón de fibras del huso, positivo para cromosomas:** El patrón de fibras del huso es propio de células que sufren mitosis en las que solamente el huso mitótico es fluorescente. Este patrón tiene una apariencia de “tela de araña” que se extiende desde los centriolos hacia los centrómeros. El patrón sugiere autoanticuerpos frente a los microtúbulos y su significado no es claro; sin embargo, se ha sugerido una asociación entre el patrón de fibras del huso y el síndrome de túnel carpiano.
2. **Patrón de cuerpo intermedio:** El patrón de cuerpo intermedio es una región de tinción muy densa cercana al surco de escisión de células en telofase, esto es, en el área en la que dos células hijas se separan. Se desconoce el significado clínico del patrón; sin embargo, se ha reconocido este patrón en pacientes seleccionados con esclerosis sistémica.
3. **Patrón centriolar:** El patrón centriolar se caracteriza por dos puntos de fluorescencia manifiestos en el núcleo de las células mitóticas o un punto de fluorescencia manifiesto en la célula en reposo. Se desconoce el significado de este patrón; sin embargo se ha observado en la esclerosis sistémica progresiva (PSS).
4. **Patrón de antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA):** El patrón de antígeno nuclear de células proliferantes se observa como un moteado nuclear de fino a grueso en un 30 - 60 % de las células en interfase y una tinción negativa de la región cromosómica de las células mitóticas. El PCNA es muy específico para pacientes con LES pero no se detecta en otros trastornos de enfermedades del tejido conectivo. Se ha informado que los pacientes con LES que presentan un patrón PCNA tienen una incidencia más alta de glomerulonefritis difusa.
5. **Membrana antinuclear (láminas nucleares):** El patrón de membrana antinuclear aparece como un anillo alrededor del núcleo y se parece a un patrón de anillo; sin embargo, se distingue de este por el hecho de que la etapa de metafase del cromosoma es negativa. Es importante informar este autoanticuerpo porque se reconoce que está asociado con la enfermedad hepática autoinmune.

Patrones citoplasmáticos

1. **Patrón mitocondrial (AMA):** Característicamente, este patrón tendrá numerosas motas citoplasmáticas y su mayor concentración será en el área perinuclear. Este patrón se puede observar en células mitóticas y en interfase. El significado clínico del AMA es, con mayor frecuencia, indicación de cirrosis biliar primaria, en especial cuando el AMA tiene un título alto.

2. **Patrón de aparato de golgi:** El patrón de aparato de golgi está caracterizado por tinción citoplasmática positiva que se concentra solamente en un lado de la región perinuclear. El significado clínico es incierto, pero informes de la bibliografía han sugerido una asociación con LES y síndrome de Sjögren.
3. **Patrón lisosomal:** El patrón lisosomal se observa como unas pocas motas separadas, poco espaciadas por el citoplasma. Este patrón se puede observar en el citoplasma de células mitóticas y en interfase. No se conoce su significado clínico.
4. **Patrón ribosomal:** El patrón ribosomal se caracteriza por la presencia de numerosas motas citoplasmáticas, cuya mayor concentración estará alrededor del núcleo. Se distingue del patrón mitocondrial por las motas más pequeñas y por una mayor densidad. No se conoce el significado de este patrón.
5. **Patrón citoesquelético:** El patrón citoesquelético se caracteriza por una manifiesta apariencia de “tela de araña” o fibrosa en toda la célula. Se ha informado que está asociado con la enfermedad hepática autoinmune (antimúsculo liso).

Negativo para ANA

Los autoanticuerpos frente a SSA/Ro están presentes con mucha frecuencia en un subconjunto clínico de lupus denominado Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo (LECS). Muchos pacientes con LECS han sido falsamente etiquetados como pacientes con lupus “negativo para ANA”. Muchos de los pacientes etiquetados como LE “negativo para ANA” mostrarán una IF positiva para ANA en un sustrato de células HEP-2 que contengan antígeno SSA/Ro (20). Los anticuerpos anti-SSA/Ro pueden estar presentes en ausencia de los ANA tradicionales; se ha observado LES en personas con una deficiencia genética de C4 y, ocasionalmente, otras deficiencias complementarias (21, 22). Asimismo, la deficiencia de C4 puede estar asociada con una mayor susceptibilidad de sufrir LES después del tratamiento con hidralazina (25). Es probable que estos pacientes, si son mujeres, tengan hijos con bloqueo cardíaco congénito o dermatitis de lupus (26). Aunque el nivel de ANA puede no estar relacionado con la evolución clínica de un estado de enfermedad autoinmune en particular (6), los distintos patrones de tinción nuclear pueden estar asociados con estados de enfermedad específicos (3, 16 y 28 - 31).

El siguiente cuadro resume los diversos autoanticuerpos mencionados anteriormente con respecto a su asociación con una enfermedad:

Cuadro 1		
Anticuerpo	Estado de la enfermedad	% de frecuencia relativa de detección de anticuerpo
Anti-Jo-1	Miositis	25 - 44% (18)
Anti-Sm	LES	30 *
Anti-RNP	EMTC, LES	100** y >40, respectivamente
Anti-SSA/Ro	LES, Sjögren	15 y 30 - 40, respectivamente
Anti-SSB/La	LES, Sjögren	15 y 60 - 70, respectivamente
Anti-Scl-70	Esclerosis sistémica	20 - 28 *
* Altamente específico ** Altamente específico cuando se presenta solo y con título alto		

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El sistema de prueba IFA ANA HEP-2 de ZEUS está diseñado para detectar la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en suero humano. El ensayo utiliza sustrato de cultivo celular de tejido y antiinmunoglobulina humana de cabra ajustada para un uso óptimo y libre de tinción de fondo no específica. La reacción sucede en dos pasos:

1. El paso uno es la incubación de la muestra, donde todo ANA presente en la muestra del paciente puede unirse al sustrato celular y formar un complejo antígeno-anticuerpo. Otros componentes del suero se eliminarán posteriormente mediante lavado.
2. El paso dos es la incubación del conjugado, en la cual la antiinmunoglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) puede reaccionar con cualquier inmunoglobulina humana que se haya unido al sustrato durante la incubación de la muestra. Esto formará un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado en la ubicación en la que el anticuerpo del paciente inicial se unió al sustrato celular. El exceso de conjugado se eliminará posteriormente mediante lavado. Los resultados del ensayo se pueden visualizar utilizando un microscopio de fluorescencia debidamente equipado. Toda reacción positiva aparecerá como una tinción fluorescente de color verde manzana dentro de la célula. Si la muestra no tiene un ANA específico, no habrá una tinción nuclear manifiesta de la célula.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBA

Materiales provistos:

Cada sistema de prueba contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: El conjugado y los controles contienen una combinación de Proclin (0,05% v/v) y azida sódica (<0,1% p/v) como conservantes. El diluyente SAVe Diluent® contiene azida sódica (<0,1% p/v) como conservante.**

●●●	1. Portaobjetos con sustrato de HEP-2 para ANA: Diez portaobjetos de 12 pocillos con secante absorbente y bolsa desecante.
CONJ	2. Conjugado: Antiinmunoglobulina humana de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contiene tampón de fosfato con albúmina de suero bovino (BSA) y contratinción. Un frasco de 3.5mL, con tapa color ámbar. Listo para usar.
CONTROL +	3. Control positivo (suero humano): Producirá una tinción del núcleo celular positiva, homogénea, de color verde manzana. Un vial de 0,5mL, de tapa roja. Listo para usar.
CONTROL -	4. Control negativo (suero humano): No producirá una tinción nuclear detectable. Un vial de 0,5mL, de tapa verde. Listo para usar.
DIL SPE	5. Diluyente SAVe Diluent®: Dos frascos de 30 mL, de tapón verde, que contienen solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
BUF PBS	6. Solución salina tamponada con fosfato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Para preparar el PBS, vacíe el contenido de cada paquete de tampón en un litro de agua destilada o desionizada. Mezcle hasta que todas las sales se hayan disueltos por completo. Cuatro paquetes, cantidad suficiente para preparar 4 litros.
MNTMED	7. Medio de montaje (Glicerol tamponado): Dos viales con punta de gotero de 3,0mL, de tapa blanca.

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del Número de Lote del Sistema de Prueba y se pueden usar indistintamente con los Sistemas de Prueba IFA de Zeus, en tanto los números de producto sean iguales: Diluyente SAVe Diluent® (N.º de producto: FA005CC), Medio de Montaje (N.º de producto: FA0009S) y PBS (N.º de producto: 0008S).
2. El Sistema de prueba también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del Sistema de prueba.

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro exclusivamente.
2. Tenga las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No respire los vapores. Respete todas las leyes locales, estatales y federales para la eliminación de residuos.

- Los pocillos del portaobjetos no contienen organismos viables. No obstante, considere los portaobjetos **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelos de manera acorde.
- Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Se ha determinado mediante métodos de prueba aprobados que los materiales utilizados como fuente de estos productos resultaron negativos para el antígeno de VIH-1, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y para anticuerpos contra el VHC y el VIH. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (20).
- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Ponga los reactivos no utilizados en su recipiente original inmediatamente y siga los requisitos de almacenamiento.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Asegúrese de minimizar la cantidad de cualquier PBS residual mediante secado con secante antes de agregar el conjugado. No permita que los pocillos se sequen entre incubaciones.
- El diluyente SAVe Diluent®, el conjugado y los controles contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha informado que la azida sódica forma azidas de plomo o cobre en las cañerías del laboratorio, lo que puede ocasionar explosiones al golpear con un martillo. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar la solución que contiene azida sódica. Este conservante puede ser tóxico si se ingiere.
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras del paciente con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Pueden ocasionarse resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras puede ocasionar resultados erróneos.
- Los objetos de vidrio reutilizables deben lavarse y enjuagarse bien para eliminar todos los detergentes.
- Evite salpicar o generar aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Para proteger a los pocillos y al secante de la condensación, deje que el paquete de portaobjetos se equilibre hasta alcanzar temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía doméstica - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Trazas de lejía (hipoclorito de sodio) pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos de este Sistema de prueba.
- No aplique presión sobre el sobre de los portaobjetos. Esto puede dañar el sustrato.
- Los componentes de este Sistema de prueba están emparejados para proporcionar una sensibilidad y reproducibilidad óptimas. No se deben intercambiar con reactivos de otros fabricantes. Siga las instrucciones del prospecto del paquete cuidadosamente.
- Los componentes sin abrir/abiertos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta, siempre que se respeten estrictamente las condiciones de almacenamiento recomendadas. No utilizar después de la fecha de caducidad. No congelar.
- La contratinción de Azul de Evans es un material potencialmente carcinógeno. Si hay contacto con la piel, enjuague con agua. Elimínelo conforme a las regulaciones locales.
- No permita que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento. Según las condiciones del laboratorio, puede ser necesario colocar los portaobjetos en una cámara húmeda durante las incubaciones.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas serológicas pequeñas, Pasteur, capilares o automáticas.
- Puntas de pipetas descartables.
- Tubos de ensayo pequeños, de 13 x 100 mm o similares.
- Gradillas para tubos de ensayo.
- Placa de tinción: Una placa de tinción grande con un conjunto de mezclado magnético pequeño proporciona un mecanismo ideal para lavar los portaobjetos entre los pasos de incubación.
- Cubreobjetos, de 24 x 60 mm, grosor N.º 1.
- Agua destilada o desionizada.
- Microscopio de fluorescencia debidamente equipado.
- Una bureta graduada de 1 litro.
- Cronómetro de laboratorio para controlar los pasos de incubación.
- Lavabo de eliminación y desinfectante (es decir: 10 % de lejía doméstica - 0,5 % de hipoclorito de sodio).

Se ha determinado que los siguientes sistemas de filtro o sus equivalentes, son satisfactorios para el uso de rutina con montajes de campo oscuro de iluminación incidente o transmitida:

Iluminación transmitida			
Fuente de iluminación: Vapor de mercurio 200 W o 50 W			
Filtro de excitación	Filtro de barrera	Filtro de supresión de rojo	
KP490	K510 o K530	BG38	
BG12	K510 o K530	BG38	
FITC	K520	BG38	
Fuente de iluminación: Tungsteno – Halógena 100 W			
KP490	K510 o K530	BG38	

Iluminación incidente			
Fuente de iluminación: Vapor de mercurio 200, 100, 50 W			
Filtro de excitación	Espejo dicroico	Filtro de barrera	Filtro de supresión de rojo
KP500	TK510	K510 o K530	BG38
FITC	TK510	K530	BG38
Fuente de iluminación: Tungsteno – Halógena 50 y 100 W			
KP500	TK510	K510 o K530	BG38
FITC	TK510	K530	BG38

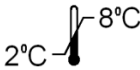
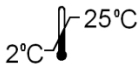
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protección de los trabajadores de laboratorio de enfermedades infecciosas ("Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease"). Ningún método

de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de sangre humana deben considerarse potencialmente infecciosos.

- En este ensayo utilice solamente suero recién extraído y correctamente refrigerado obtenido mediante procedimientos de venipunción asépticos aprobados (30, 31). No se deben agregar anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar suero hemolizado, lipémico o contaminado con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si prevé retrasos para realizar la prueba, almacene el suero de prueba a -20° C o menos. Evite múltiples ciclos de congelado/descongelado que pueden ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y proporcionar resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (38).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Sistema de prueba sin abrir
	Medio de montaje, conjugado, diluyente SAVe Diluent®, portaobjetos, control positivo y control negativo.
	PBS rehidratado (estable durante 30 días).
	Paquetes de solución salina tamponada con fosfato (PBS):

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Saque los portaobjetos del lugar de almacenamiento refrigerado y deje que se entibien hasta alcanzar temperatura ambiente (20 - 25 °C). Abra el sobre protector y saque los portaobjetos. **No aplique presión sobre los lados planos del sobre protector.**
- Identifique cada pocillo con el suero del paciente y los controles adecuados. **NOTA: Los controles están diseñados para ser utilizados sin diluir.** Prepare una dilución 1:40 (por ejemplo: 10 µL de suero + 390 µL de diluyente SAVe Diluent® o PBS) de cada suero de paciente. **El diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
Opciones de dilución:
 - Como opción, los usuarios pueden preparar diluciones de muestra iniciales utilizando PBSorba-NS (Zorba-NS está disponible por separado. Orden Número FA025-2, botellas de 30 ml).
 - Los usuarios pueden titular el control positivo hasta el punto final para que sirva como un control semicuantitativo (1+ mínimamente reactivo). En tales casos, el control debe diluirse dos veces en diluyente SAVe Diluent® o PBS. Cuando es evaluado en ZEUS Scientific, se establece una dilución de punto final y se imprime en el vial del control positivo (± una dilución). Debe tenerse en cuenta que debido a las variaciones dentro del laboratorio (equipos, etc.), cada laboratorio debe establecer su propio título de punto final esperado por cada lote de control positivo.
 - Cuando se titulan las muestras de pacientes, las diluciones iniciales deben prepararse en diluyente SAVe Diluent®, PBS o Zorba-NS, y todas las diluciones subsiguientes deben prepararse en diluyente SAVe Diluent® o PBS exclusivamente. Las titulaciones no deben prepararse en Zorba-NS.
- Con un dispensador adecuado (enumerado anteriormente), dispense 20 - 40 µL de cada control y cada suero de paciente diluido en los pocillos correspondientes.
- Incube los portaobjetos a temperatura ambiente (20 - 25° C) durante 20 - 30 minutos.
- Con suavidad, enjuague los portaobjetos con PBS. **No dirija un chorro de PBS hacia el interior de los pocillos de prueba.**
- Lave los portaobjetos durante dos intervalos de 5 minutos, cambiando el PBS entre lavados. Los portaobjetos pueden dejarse en remojo durante cada lavado por hasta cinco minutos. **NOTA: Para aquellos que utilizan lavadoras automáticas, programar la lavadora para lavar cada pocillo tres veces con un remojo de cero a cinco minutos.**
- Saque los portaobjetos del PBS uno a uno. Invierta el portaobjeto y los pocillos clave sobre los orificios de los secantes provistos. Seque el portaobjeto pasando un paño absorbente por la parte posterior. **PRECAUCIÓN:** Coloque el secante y el portaobjeto sobre una superficie dura y plana. El secado sobre toallas de papel puede destruir la matriz del portaobjeto. **No permita que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de prueba.**
- Agregue 20 - 40 µL de conjugado en cada pocillo.
- Repita los pasos 4 a 7.
- Aplique 3 - 5 gotas de medio de montaje a cada portaobjeto (entre los pocillos) y cubreobjetos. El medio de montaje se debe agregar dos horas después de completar el último ciclo de lavado. Examine los portaobjetos inmediatamente con un microscopio de fluorescencia adecuado. Si no es posible ver los portaobjetos inmediatamente, estos pueden guardarse por un período de hasta 48 horas a una temperatura de entre 2 y 8° C.
NOTA: Si los portaobjetos no va a ser examinados en un período de 48 horas, selle el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente y almacene en un refrigerador. Se recomienda examinar los portaobjetos el mismo día en que se hace la prueba.

CONTROL DE CALIDAD

- Cada vez que se realiza un ensayo, se debe incluir un control positivo, un control negativo y un control de tampón.
- Se recomienda leer los controles antes de evaluar las muestras de prueba. Si la apariencia de los controles no es la descrita, los resultados pueden ser inválidos.
 - Control negativo: Caracterizado por la ausencia de fluorescencia específica y una tinción de fondo roja o verde apagado de todas las células debido a la contratinción.
 - Control positivo (patrón homogéneo): Caracterizado por una fluorescencia de color verde manzana. El patrón de tinción homogéneo es una tinción uniforme difusa de todo el núcleo.
- Se pueden probar otros controles conforme a las directrices o requisitos establecidos por las normativas locales, estatales o federales o las organizaciones acreditadoras.

NOTA:

- Pueden quedar atrapados reactivos no específicos. Es importante lavar adecuadamente los portaobjetos para eliminar los resultados de falsos positivos.
- La intensidad de la fluorescencia observada puede variar con el microscopio y el sistema de filtro usados.
- Se puede observar tinción no nuclear del sustrato celular en algunos sueros humanos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- La interpretación de los resultados depende del patrón observado, el título del autoanticuerpo y la edad del paciente. Los pacientes de edad más avanzada, en particular las mujeres, tienden a desarrollar autoanticuerpos de títulos bajos (<1:80) en ausencia de enfermedad autoinmune clínica. En cambio, un título de 1:20 de un patrón significativo de autoanticuerpo(s) en una persona joven puede sugerir que una enfermedad manifiesta puede suceder posteriormente. La experiencia sugiere que una dilución de 1:40 es una buena dilución para detectar ANA. Pueden darse resultados positivos de título bajo en personas aparentemente sanas; por lo tanto, los resultados de ANA siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la presentación clínica total del paciente.
- Los títulos inferiores a 1:40 se consideran negativos.

- Prueba positiva: Una reacción positiva está dada por la presencia de cualquier patrón de tinción nuclear de color verde manzana observada en una dilución 1:40 basada en una escala de intensidad de tinción de 1+ a 4+. 1+ se considera una reacción débil y 4+ una reacción fuerte. Todos los sueros positivos a una dilución 1:40 deben titularse hasta dilución de punto final. Esto se logra realizando diluciones seriadas de 1:40, 1:80, 1:160, etc. de todos los positivos. El título de punto final es la dilución más alta que produce una reacción positiva de 1+.
- Los patrones homogéneos con acentuación periférica se encuentran frecuentemente en pacientes con LES.

Patrón	Enfermedad que se encuentra más frecuentemente en	Referencia
Homogéneo: Título alto Título bajo	LES Artritis reumatoide y otras enfermedades	(3, 8, 9 y 16) (1)
Centromérico	Variante de síndrome de CREST de esclerosis sistémica progresiva (PSS)	(27)
Moteado	Escleroderma, fenómeno de Raynaud, síndrome de Sjögren, Enfermedad mixta del tejido conectivo	(34 - 36)
Nucleolar	Escleroderma	(37)
Periférico	LES	(2, 8, 9 y 16)

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- El sistema de prueba IFA ANA HEP-2 de ZEUS es una herramienta para el diagnóstico de laboratorio, pero no es en sí una prueba diagnóstica. Se pueden encontrar resultados positivos de ANA en personas aparentemente sanas. Por lo tanto, es imperativo que los resultados de ANA sean interpretados por una autoridad médica que tenga en cuenta la condición clínica del paciente.
- Los pacientes con LES que están recibiendo tratamiento con esteroides pueden tener resultados de prueba negativos.
- Muchos fármacos comúnmente recetados pueden inducir ANA (6, 7).
- Un patrón de autoanticuerpos puede oscurecer parcial o completamente las características diagnósticas de otro patrón. En esos casos, es necesario titular el suero.
- No se pretende crear con este producto una asociación definitiva entre el patrón de fluorescencia nuclear y cualquier estado de enfermedad específico.

RESULTADOS ESPERADOS

El valor esperado en la población normal es negativo o inferior a 1:40. Sin embargo, las personas aparentemente sanas pueden tener ANA en su suero (36). Este porcentaje se incrementa con la edad, en particular cuando se está en la década de los 70 años.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMIENTO

El sistema de prueba IFA ANA HEP-2 de ZEUS se probó en paralelo con un procedimiento de referencia que utiliza sustrato de hígado de rata. Se realizaron pruebas de ANA de rutina con ambos procedimientos en muestras de 434 pacientes. De estos 434 sueros, 116 fueron positivos con ambos procedimientos. El Sistema de prueba IFA ANA HEP-2 de ZEUS mostró un 97 % de concordancia con respecto a resultados positivos y negativos, y un 100 % con respecto al patrón de tinción. De las 21 discrepancias en título, el procedimiento IFA ANA HEP-2 de ZEUS fue una dilución inferior en 18 muestras. Cinco de estas 18 muestras que fueron negativas con el procedimiento IFA ANA HEP-2 de ZEUS fueron positivas a una dilución de 1:20 con el procedimiento de referencia en hígado de rata.

REFERENCIAS

- Barnett EV: Mayo. Clin. Proc. 44:645, 1969.
- Burnham TK, Fine G, Neblett TR: Ann. Int. Med. 63:9, 1966.
- Casals SP, Friou GJ, Meyers LL: Arthritis Rheum. 7:379, 1964.
- Condemni JJ, Barnett EV, Atwater EC, et al: Arthritis Rheum. 8:1080, 1965.
- Dorsch CA, Gibbs CB, Stevens MB, Shelman LE: Ann. Rheum. Dis. 28:313, 1969.
- Dubois EL: J. Rheum. 2:204, 1975.
- Alarcon-Segovia D, Fishbein E: J. Rheum. 2:167, 1975.
- Friou GJ: J. Clin. Invest. 36:890, 1957.
- Friou GJ, Finch SC, Detre KD: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Coons AH, Creech H, Jones RN, et al: J. Immunol. 80:324, 1958.
- Barnett EV, North AF, Condemni JJ, Jacox RF, Vaughn JH: Ann. Intern. Med. 63:100, 1965.
- Lachman PJ, Kunkel HG: Lancet 2:436, 1961.
- Friou GJ: Arthritis Rheum. 7:161, 1964.
- Beck JS: Scot. Med. J. 8:373, 1963.
- Anderson JR, Gray KG, Beck JS, et al: Ann. Rheum. Dis. 21:360, 1962.
- Luciano A, Rothfield NF: Ann. Rheum. Dis. 32:337, 1973.
- Harmon C, Deng JS, Peebles CL, et al: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
- Peebles CL, Molden DP, Klipple GL, Nakamura RM: An antibody to histone H3 which produces a variable large speckled (VLS) immunofluorescent pattern on mouse kidney. Arthritis Rheum. 27:S44, 1984.
- Ritchie RF: Antinuclear antibodies: Their frequency and diagnostic association. N. Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
- Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JN: Relationships between antinuclear and anti-Ro/SS-A antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. J. Am. Acad. Dermatol. 11:494-499, 1984.
- Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, Ochs HD, Mascart-Lemone F: Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SSA) antibodies. Clin. Exp. Immunol. 62:678-684, 1985.
- Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. Arthritis Rheum. 26:1279-1282, 1983.
- Speirs C, Fielder AHL, Chapel H, et al: Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. Lancet 1:922-924, 1989.
- Watson RM, Scheel JN, Petri M, et al: Neonatal lupus erythematosus syndrome: Analysis of C4 allotypes and C4 genes in 18 families. Medicine 71:84-95, 1992.
- Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C: Arthritis Rheum. Vol. 23 No. 6:617, 1980.
- Hall AP, Bardawil WA, Bayles TB, et al: N. Engl. J. Med. 263:769, 1960.
- Pollack VE: N. Engl. J. Med. 271:165, 1964.
- Raskin J: Arch. Derm. 89:569, 1964.
- Beck JS, Anderson JR, Gray KG, Rowell NR: Lancet 2:1188, 1963.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second edition; Approved Standard (1984). Published by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
- Beck JS: Lancet, 1:1203, 1961.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, et al: Am. J. Med. 52:48, 1972.

34. Burnham TK, Neblett TR, Fine G:Am. J. Clin. Path. 50:683, 1968.
35. Textbook of Immunopathology, Vol II, P Miescher and HJ Muller-Eberhard (Eds), Glune & Stratton, NY, 1969.
36. Wittingham S. Irvin J, Mackay IR, *et al*:Aust. Ann. Med. 18:130, 1969.
37. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
38. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

ZEUS IFA y SAVE Diluent® son marcas registradas de ZEUS Scientific

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.

Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

©2019 ZEUS Scientific Todos los derechos reservados.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands