

ES



## LIA para ANA avanzados ImmcoStripe™

Inmunoensayo lineal (LIA) para la detección de anticuerpos antinucleares

IVD

### ETIQUETA DEL PRODUCTO

REF 6011 LIA para anticuerpos antinucleares 20 Determinaciones  
(ANA avanzados)

### UTILIZACIÓN PREVISTA

Un inmunoensayo lineal para la detección y la identificación de anticuerpos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos asociados con enfermedades autoinmunes específicas de determinados órganos y sistemáticas.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

En general, los métodos de laboratorio para detectar niveles de anticuerpos antinucleares (ANA) presentes en sueros se utilizan como ayuda en el diagnóstico de trastornos del tejido conjuntivo, incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), síndrome de Sjögren y esclerodermia.<sup>1-5</sup> Los ANA se producen en aproximadamente el 95 % de los pacientes con LES, así como también en pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo. Los ANA también pueden producirse en otros trastornos como la hepatitis crónica activa y cirrosis biliar primaria.<sup>6-8</sup>

Los ANA no son específicos de una enfermedad; no obstante, la identificación de especificidades de determinados ANA puede utilizarse para confirmar el diagnóstico de una enfermedad en concreto o subconjunto de enfermedades. Las especificidades de los ANA se pueden determinar por la precipitación de la gelificación, hemaglutinación, IFA, ELISA, transferencia Western y otros métodos.

Los anticuerpos anti U-1 RNP son propios de pacientes con la EMTC. Los anticuerpos contra el antígeno Sm se producen exclusivamente en pacientes con LES. Los anticuerpos SS-A (Ro) se detectan en el síndrome de Sjögren y en pacientes con LES.<sup>1</sup> Los anticuerpos contra Jo-1 (histidil-ARNt sintetasa) se producen en pacientes con miositis.<sup>1,3</sup> El SS-B (La) se presenta principalmente en pacientes con LES y en el síndrome de Sjögren. Los anticuerpos contra el 52 kD SS-A (Ro) y el 48 kD SS-B (La) se encuentran prácticamente en todos los pacientes con lupus eritematoso neonatal y con bloqueo cardíaco completo, y la presencia de ambos en pacientes con LES indica la aparición de la enfermedad en años posteriores y una frecuencia inferior de nefritis lúpica.<sup>9</sup> Los anticuerpos Scl-70 reaccionan con topoisomerasa humana y se encuentran en pacientes con esclerodermia difusa. Los anticuerpos contra las proteínas asociadas a la remodelación de los nucleosomas y al mantenimiento del genoma como Mi2 y Ku, respectivamente, son un indicio de LES. Los autoanticuerpos contra los antígenos nucleares o citoplasmáticos dirigidos contra las ribonucleoproteínas implicadas en la síntesis de proteínas ("antisintetasa") como Jo1, PL-7, PL-12, EJ y OJ o el transporte transaccional (SRP54) se detectan aproximadamente en una quinta parte de los pacientes con polimiositis (PM) / dermatomiositis (DM). El panel del LIA para ANA avanzados puede detectar los anticuerpos contra la mayoría de los antígenos descritos anteriormente, así como también AMA-M2, un objetivo principal de los autoanticuerpos antimitocondriales, un elemento característico de la CBP (cirrosis biliar primaria). Los anticuerpos anti-DFS70 se han asociado con la población común. El panel del LIA para ANA avanzados ImmcoStripe™ es capaz de simplificar la detección de autoanticuerpos contra 22 antígenos claves que también se pueden observar por el sistema de prueba IFA en sustratos celulares HEp-2. Los antígenos siguientes se inmovilizan en las tiras de prueba: PM-Scl100, PM-Scl75, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, nucleosomas, ADN, histonas, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Scl70, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 y DFS70 (LEDGF). Además de las líneas de antígenos, se facilita una línea de control de corte, de suero y de conjugado en la parte inferior de la tira.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Para realizar el ensayo, las tiras se incuban con suero de paciente diluido. En sueros positivos, los anticuerpos se unen específicamente a una o más de las líneas de prueba de la tira. Las tiras se lavan siguiendo el protocolo y,

ES

luego, el conjugado previamente diluido y listo para su utilización se añade a las tiras de prueba. Después de la incubación y las etapas de lavado, el sustrato listo para su utilización se añade a las tiras. Durante los 10 minutos de incubación, la unión de conjugado y sustrato produce unas líneas azules/violetas visibles para las líneas de control de suero, conjugado y corte. Si la muestra es positiva para cualquiera de las líneas de prueba recubiertas de antígeno, mostrará una reacción más intensa que la línea de corte. Las reacciones se leen visualmente y se registran como positivas, negativas o ambiguas (análogo a la línea de corte).

### Materiales proporcionados

LIA para ANA avanzados **REF** 6011

El equipo contiene suficientes reactivos para realizar 20 determinaciones.

20 x **STRIP**|ANA Adv|LIA

1 x 120 µl **CONTROL**|+|ANA

1 x 30 ml **CONJ**|LIA

1 x 30 ml **SUBSTRATE**

1 x 40 ml **SAMPLE**|DIL

1 x 50 ml **BUF**|WASH|LIA

2 x

1 x

**Tiras de prueba para inmunoensayo lineal**, que contienen líneas de prueba y líneas de control recubiertas de antígeno antinuclear. Listo para su utilización.

**Control Positivo** (tapón rojo). Contiene suero humano positivo para ANA.

**Conjugado IgG**.

**Sustrato de enzima** (botella ámbar). Listo para su utilización. **Proteger de la luz**.

**Diluyente**

**Tapón de lavado concentrado**. **Reconstituir a un litro** con agua desionizada o destilada o según se necesite proporcionalmente.

Bandejas de ensayo LIA 10

Hoja de informe/puntuación

### Símbolos utilizados en las etiquetas



Número de lote



Número de catálogo



Utilización diagnóstica in vitro



Utilizar antes de



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de análisis



Fabricante



Fecha de fabricación

### Materiales necesarios pero no suministrados

- Probeta graduada limpia de 1000 ml
- Fórceps sin dientes (Fórceps para filtro)
- Graneador o agitador de plataforma giratoria
- Papel absorbente o toallitas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botellas de plástico blando para almacenar tapón de lavado diluido o agua destilada
- Pipetas capaces de suministrar de 10 µl a 1000 µl
- Extremos de pipeta desechables
- Temporizador

### REACTIVOS

#### Conservación y preparación

Conserve todos los reactivos entre 2 y 8 °C. **No los congele.**

Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-25 °C) y mezclarse de forma homogénea antes de su utilización. No lo utilice si el reactivo no está limpio o si contiene un precipitado insoluble. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad, mientras se almacenen a una temperatura entre 2 y 8 °C y se preserven de la contaminación, o tal como se indica a continuación una vez abierto o tras la reconstitución.

ES

- Las tiras de prueba recubiertas de antígeno **STRIPANA AdvLIA** están listas para su utilización. Deje que la bolsa que contiene las tiras de prueba alcance la temperatura ambiente antes de abrirla para evitar la condensación y el deterioro asociado. Vuelva a colocar en la bolsa las tiras de prueba que no utilice y almacénela entre 2 y 8 °C en un lugar seco y oscuro.
- El diluyente de muestra **DIL** está listo para su utilización. Una vez abierto, el diluyente de muestra estará estable durante al menos 8 semanas mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana o química.
- Reconstituir 1 parte de **BUFWASHLIA** en 19 partes de agua destilada o desionizada para obtener 1 litro de tapón de lavado. El tapón de lavado estará estable durante al menos 8 semanas tras la reconstitución mientras se almacene adecuadamente y se preserve de la contaminación microbiana.
- **CONJLIA** y **SUBSTRATE** estarán estables durante al menos 8 semanas tras su apertura mientras se almacenen adecuadamente y se preserven de la contaminación microbiana. **SUBSTRATE** es sensible a la luz y debe almacenarse en la botella ámbar que se proporciona.

Las tiras de antígeno se pueden utilizar sólo una vez. No cambie los componentes de lotes diferentes. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

### Precauciones

Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Sin embargo, los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deberían considerarse potencialmente infecciosos. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar los materiales indicados.<sup>10</sup>

ADVERTENCIA: Proclin 300 es un conservante. A la hora de desechar líquidos que contengan Proclin 300, lave con abundante agua para diluir los componentes por debajo de los niveles activos.

**Deben seguirse las instrucciones exactamente tal como aparecen aquí para garantizar unos resultados válidos.** No cambie los componentes del equipo por otros de fuentes externas. Siga unas buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos a la hora de manejarlos. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas.

### RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECÍMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes con hemólisis intensa, niveles altos de lípidos o contaminación microbiana pueden interferir con el rendimiento del análisis y, por lo tanto, no deben utilizarse. Conserve los especímenes entre 2° y 8 °C durante un tiempo máximo de una semana. Para períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Se recomienda analizar los especímenes congelados en el plazo de un año. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

### PROCEDIMIENTO

#### Notas del procedimiento

- Lea detenidamente la etiqueta del producto antes de comenzar el ensayo.
- Deje que los especímenes de suero y los reactivos de prueba alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente antes de comenzar con el procedimiento de análisis. Vuelva a meter todos los reactivos y especímenes no utilizados en la nevera inmediatamente después de su utilización.
- Una técnica de lavado adecuada es fundamental para alcanzar satisfactoriamente el rendimiento del ensayo.
- Manipule las tiras de prueba únicamente con fórceps o guantes limpios. Evite tocar las zonas blancas recubiertas de antígeno.
- Las líneas de prueba están colocadas por encima de las líneas de control de corte, suero y conjugado como se describe en el esquema (Figura 1). Las líneas de control de suero y conjugado aparecen en la misma sección de nitrocelulosa en la parte inferior de la tira.

ES

- Asigne números de identificación de especímenes a las tiras correspondientes en el Formulario de informe. Cada tira tiene un número de tira y un número de lote impreso en la parte inferior para que pueda ser localizada.
- Rellene toda la información pertinente en el Formulario de informe antes de comenzar con el ensayo.

#### Método de análisis

- Paso 1** Utilizando guantes o fórceps hemostáticos, desprege la cantidad necesaria de tiras. Se debe procurar no tocar las zonas recubiertas de antígeno con las manos desnudas o fórceps puntiagudos.
- Paso 2** Coloque la cantidad necesaria de **STRIPANA AdvLIA** con la etiqueta mirando hacia arriba en los pozos individuales de la bandeja de ensayo.
- Paso 3** Pipetee 1,5 ml de **SAMPLEDIL** en cada pozo, asegurándose de que las tiras quedan totalmente sumergidas en el líquido.
- Paso 4** Incube las tiras en **SAMPLEDIL** durante al menos 10 minutos en un graneador. El color azul en el antígeno recubierto y lugares de control empieza a desaparecer una vez se empape la membrana.
- Paso 5** Pipetee 15 µl de suero o muestra de control positivo en los pozos adecuados para obtener una dilución de 1:101. Incúbelo 60 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 6** LAVADO: Aspire la solución de muestra en el contenedor de residuos. Lave minuciosamente las tiras con tapón de lavado **reconstituido** aplicando aproximadamente 2 ml de solución directamente en las tiras. Lave las tiras agitándolas suavemente durante 5 minutos y aspire la solución en el contenedor de residuos. Repita el lavado dos veces más.
- Precaución: Un lavado completo de las tiras entre las incubaciones es fundamental para obtener unos resultados válidos. Un lavado inadecuado implicaría una coloración de fondo elevada. No deje que las tiras se resequen en ninguna de las etapas durante el ensayo.
- Paso 7** Pipetee 1,0 ml de **CONJLIA** en cada pozo. Incúbelo 30 minutos (±5 min.) a temperatura ambiente en un graneador o agitador giratorio.
- Paso 8** Repita el paso 6.
- Paso 9** Pipetee 1,0 ml **SUBSTRATETMB** en cada pozo e incúbelo agitando suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente y con poca iluminación. Las líneas de control de suero y conjugado adquieren un color intenso después de la incubación en el sustrato. La línea de control de corte desarrolla una línea coloreada de vacío a débil después de la incubación.
- Paso 10** Para detener la reacción, enjuague las tiras dos veces con agua destilada/desionizada aplicando aproximadamente 2 ml de agua directamente en las tiras y, a continuación, aspírelas. No las empape/lave durante más de 10 minutos, puesto que esto podría disminuir la sensibilidad de las líneas coloreadas que se han desarrollado.
- Paso 11** Utilizando unos fórceps hemostáticos retire las tiras de la bandeja de ensayo y colóquelas suavemente en papel absorbente y déjelas que se sequen. Deje que las tiras se sequen antes de analizarlas o colocarlas en la hoja de informe/puntuación.

#### Control de calidad

Controles de procedimiento: Cada tira tiene tres controles de procedimiento para la adición de suero o conjugado y una línea de corte para determinar las reacciones débiles o negativas.

Los controles positivos y negativos están disponibles como componentes opcionales y se pueden realizar como control de calidad adicional.

Se espera que los análisis individuales mejoren el tiempo del desarrollo del sustrato en +/- 4 minutos basándose en el procesador de transferencia o métodos manuales. Se sugiere que la línea de corte sea una línea débilmente visible después de las incubaciones con sustrato.

### Interpretación

Las tiras de prueba contienen líneas de control en la parte inferior y línea de prueba encima de los controles. La parte inferior de la tira de prueba (cerca del número de serie) tiene tres líneas de control: la línea de corte, la línea de control de suero y la línea de control de conjugado desde arriba hasta abajo. El corte le permite al técnico determinar si el resultado es positivo, negativo o indeterminado (+/-). Las dos líneas de control del procedimiento aseguran la adición de espécimen, conjugado o sustrato.

Compare la reacción de las líneas de prueba con aquellas de los controles. Utilice una lupa para ayudarlo en la observación de las reacciones débiles.

- Como aparece en la etiqueta de la Figura 1, las líneas de control de suero y conjugado deben ser claramente positivas indicando que el experimento tuvo éxito. El corte es una línea débil con variación en intensidad basado en las condiciones experimentales. El esquema de la Figura 1 muestra un ejemplo de línea de prueba. En el LIA para ANA avanzados (Figura 2) hay 22 líneas de prueba y 3 líneas de control. El desarrollo de la línea de prueba depende de la muestra. Las reacciones positivas pueden presentar intensidades variables de débil a fuerte. **Las reacciones débiles deben compararse con la intensidad de la línea de corte que se facilita en la tira.** Las reacciones que son claramente

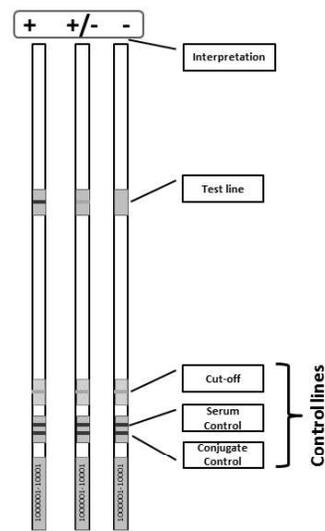


Figura 1: Esquema de tiras LIA de reacción con una línea de prueba.

más oscuras o más densas que la intensidad de la línea de corte deben considerarse positivas.

- Las tiras deben mostrar un fondo descolorido u homogéneo debido a los diversos factores que interfieren en los sueros lipémicos o hemolíticos. Asimismo, este efecto se puede ver si las tiras de prueba no se bloquean lo suficiente o se permite accidentalmente que se sequen durante el ensayo.
- En caso de reacciones positivas o negativas débiles, la intensidad de la línea de reacción debe compararse con la línea de corte para determinar el resultado como negativo (intensidad más débil que la línea de corte) o ambiguo (+/-, indistinguible de la línea de corte). La visualización de las reacciones débiles se mejora cuando las tiras están completamente secas. Las muestras ambiguas deben confirmarse siguiendo un método alternativo.
- Las tiras secas se pueden agrupar en la hoja de informe/puntuación que se facilita. La tapa de protección de plástico está fija permanentemente a la hoja de informe en el borde izquierdo. Despegue con cuidado la tapa de plástico de derecha a izquierda como al pasar la página de un libro. Coloque las tiras de reacción en la cinta adhesiva en el espacio correspondiente y vuelva a colocar la tapa de plástico en su lugar. La tapa de protección de plástico está diseñada para que se reutilice en múltiples secciones de experimentos y las tiras se pueden colocar en los espacios correspondientes. El técnico puede utilizar el formulario para registrar los números de lote de los reactivos utilizados, el número de espécimen y los resultados/comentarios.

Figura 2: Esquema de la hoja de informe

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especímenes de suero. Los especímenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. No conserve los especímenes entre 2 y 8 °C durante más de una semana. Para períodos de almacenamiento más largos, los especímenes de suero deberían ser congelados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

El LIA para ANA avanzados solo debe utilizarse como ayuda en el diagnóstico. Los resultados positivos se pueden encontrar en otras condiciones autoinmunitarias o ciertas enfermedades infecciosas. Como

ES

consecuencia una autoridad médica debe valorar e interpretar los resultados en función del historial clínico del paciente y otros resultados de laboratorio.

### **VALORES ESPERADOS**

En el título 1:40, los niveles elevados de anticuerpos antinucleares y citoplasmáticos pueden estar presentes en más del 30 % de los individuos de una población "normal", tal como determina el método IFA. En un título de tasa de positividad de 1:320 en la población normal se ha indicado una caída de aproximadamente el 3 %. La incidencia de positividad de autoanticuerpos varía en gran medida basada en los antígenos específicos, estudios y cohorte seleccionado de especímenes. Los valores esperados en una población normal son negativos en el LIA. Los paneles del LIA están diseñados para ofrecer una sensibilidad y especificidad óptimas. Se recomienda confirmar el resultado positivo con un método alternativo.

### **CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

#### **Especificidades de los antígenos**

El LIA para ANA avanzados es capaz de detectar autoanticuerpos contra los siguientes antígenos: PM-Scl100, PM-Scl75, Ro-52, Ro-60, Jo-1, Ribo-P, nucleosomas, ADN, histonas, Sm, U1RNP68, U1RNP A, U1RNP C, SS-B/La, Scl-70, Cenp-B, PCNA, Mi-2, Ku, SRP-54 y AMA-M2 y DFS70 (LEDGF). Consulte la Figura 2 para obtener antígenos individuales y puestos de línea de control.

#### **Reactividad cruzada**

Un panel de sueros de enfermedades autoinmunes potencialmente con reactividad cruzada de las condiciones no asociadas con los ANA se analizó utilizando la prueba LIA para ANA avanzados. Una de 550 determinaciones demuestra una reacción positiva, lo que indica una especificidad del 99,8 % en esta población.

#### **Interferencia**

La interferencia se estudió mezclando sueros con niveles de autoanticuerpos conocidos para cada analítico con muestras potenciales de suero interferentes y estudiando la desviación de los resultados esperados. No se demostró una interferencia importante para las siguientes sustancias en los niveles indicados: hemoglobina (5 mg/ml), bilirrubina (0,4 mg/ml), factor reumatoideo (200 EU equivalente) y triglicéridos (25 mg/ml). Las pruebas de interferencia se han realizado según las directrices del CLSI (publicación EP7-A2).

#### **Reproducibilidad**

Los ensayos de muestras en el ámbito negativo, ambiguo o positivo se realizaron para determinar la reproducibilidad cualitativa de prueba a prueba y de operador a operador. Los resultados produjeron un acuerdo cualitativo del 100 %.