



MANUAL DE INSTRUCCIONES

REF 4289

24 de enero de 2018

ANA 12 LINE

- 20 x 12 determinaciones -



IVD Producto para diagnóstico *in vitro*

Inmunoensayo lineal para la determinación de anticuerpos IgG contra antígenos nucleares y citoplasmáticos en suero o plasma humano

INDICACIÓN DE USO

ANA 12 LINE es usado para la determinación cualitativa por separado de autoanticuerpos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos (dsDNA, nucleosomas, Sm, ribosomas, histonas, RNP, SS-A 60 kDa, SS-A 52 kDa, SS-B, Scl-70, CENP-B y Jo-1) en suero o plasma humano.

Las enfermedades sistémicas autoinmunes (tales como lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo) están caracterizadas por la producción de una variedad de autoanticuerpos dirigidos contra componentes del núcleo o plasma celular.

Aunque el significado y la relevancia patológica de algunos de estos anticuerpos no han sido aún completamente dilucidados, la detección de estos autoanticuerpos juega un papel importante en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas.

ANA 12 LINE permite la detección tanto de autoanticuerpos contra nucleosomas como contra antígenos nucleares extraíbles y antígenos citoplasmáticos.

Por otra parte, **ANA 12 LINE** ofrece una opción rápida y efectiva para la determinación simultánea de varios autoanticuerpos de importancia en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas en una misma prueba. Mediante el análisis de series pequeñas o grandes, **ANA 12 LINE** representa una excelente alternativa con respecto a otras técnicas.

Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989, 44, 93-151

* * *

PRINCIPIO DEL ENSAYO

ANA 12 LINE es una prueba sensitiva tipo inmunoensayo lineal para la determinación de anticuerpos contra dsDNA, nucleosomas, Sm, ribosomas, histonas, RNP, SS-A 60 kDa, SS-A 52 kDa, SS-B, Scl-70, CENP-B y Jo-1 en suero o plasma humano.

Cada kit **ANA 12 LINE** contiene 20 tiras de ensayo numeradas, cada una de las cuales presenta 12 líneas recubiertas con antígenos específicos: dsDNA, nucleosomas, Sm, ribosomas (P0), complejo histona, RNP (A, C, 68 kDa), SS-A 60 kDa, SS-A 52 kDa, SS-B, Scl-70, CENP-B y Jo-1, respectivamente. Tres líneas adicionales sirven como control positivo, control negativo y como control del conjugado.

El suero de los pacientes se incuba en la bandeja de ensayo junto con las tiras. Durante la primera incubación, los anticuerpos presentes en la muestra del paciente se unen a los autoantígenos correspondientes inmovilizados en la fase sólida de las tiras. Luego de un período de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente (TA) bajo agitación, los componentes del suero no fijados son removidos mediante un paso de lavado.

Durante un segundo periodo de incubación (TA, agitación), los anticuerpos fijados reaccionan específicamente con anticuerpos IgG-anti-humana, conjugados con peroxidasa de rábano picante. Luego de un período de incubación de 30 minutos, el conjugado en exceso es separado de los complejos inmunes de la fase sólida mediante un paso adicional de lavado.

En el paso siguiente, la peroxidasa de rábano picante (HRP) convierte la solución de sustrato añadida (incolores) en una solución de color azul oscuro. Luego de 10-12 minutos de incubación bajo agitación, la reacción es detenida mediante un paso de lavado.

Las tiras se dejan secar por lo menos durante 30 minutos. Las líneas de reacción adquieren los patrones de coloración definidos por los anticuerpos presentes en la correspondiente muestra de suero. Las tiras se leen sobre la plantilla patrón incluido con el kit. Los resultados son considerados positivos si la coloración de las líneas en consideración es más intensa que la coloración de la línea del control negativo.



GA GENERIC ASSAYS GmbH

Ludwig-Erhard-Ring 3

15827 Dahlewitz, Alemania

Teléfono: +49 (0) 33708-9286-0
Fax: +49 (0) 33708-9286-50

www.genericassays.com

MUESTRAS DE PACIENTES

Toma de muestra y almacenamiento

La sangre se extrae por punción venosa. Tras el periodo de coagulación se separa el suero por centrifugación. También pueden utilizarse muestras de plasma. No deben utilizarse muestras hemolisadas o contaminadas, ni con un elevado contenido en lípidos. El uso de muestras lipémicas o hemolíticas aumenta la reacción de fondo y puede conducir a resultados falso positivos.

Las muestras pueden conservarse entre 2° C y 8° C hasta por 3 días. Para periodos prolongados se deben conservar a -20° C. Deben evitarse ciclos repetidos de congelación/descongelación. Si las muestras se van a utilizar en varios ensayos, se recomienda que se hagan alícuotas desde el principio y se conserven a -20° C.

Preparación previa al uso

Las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de comenzar el ensayo. Se debe tener la precaución de agitar cuidadosamente las muestras de suero para asegurar su homogeneidad.

Nota: *Deben usarse muestras limpias y diluirse 1 + 75 directamente en la bandeja de incubación.*

Materiales requeridos

- micropipeta 100 - 1000 µl
- micropipeta 10 - 100 µl
- puntas de pipeta
- pipeta multicanal
- cubeta para pipeta multicanal
- cilindros graduados
- Agua destilada o desionizada
- Tubos de 2 ml
- Agitador horizontal de placa
- Pinzas plásticas

* * *

COMPONENTES DEL ENSAYO

para 20 x 12 determinaciones

A **Tiras** 20 tiras

Ag

20 tiras numeradas, cada una con:
 - 12 líneas recubiertas con antígenos específicos:
 dsDNA (purificado), nucleosomas (aviar), Sm (bovina), P0 (humano recombinante), complejo histona (purificado), RNP (68 kDa, A, C; humano recombinante), SS-A (60 kDa, bovino), SS-A 52 kDa (humano recomb.), SS-B (humano recombinante), Scl-70 (humano recombinante), CENP-B (humano recombinante), Jo-1 (humano recombinante)
 - Control positivo
 - Control negativo
 - Control del conjugado

B **Tampón (para dilución 1:10)** 45 ml
BUF tampón de lavado suficiente para 450 ml concentrado
WASH (incoloro) tapa blanca
10x

C **Diluyente de muestra** 45 ml
 (colorado amarillo) listo para usar
 tapa negra

D **Conjugado** 45 ml
 anti-IgG humana (oveja), conjugada con
 peroxidasa de rábano picante listo para usar
CONJ (colorado rojo) Tapa roja

E **Sustrato** 45 ml
SOLN 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en
 tampón citrato conteniendo peróxido de
TMB hidrógeno listo para usar
 (botella negra) tapa azul

F **Bandeja de incubación** 2
 para 10 tiras

G **Plantilla de interpretación** 1
 para pegar las tiras procesadas

Tamaño y almacenamiento

ANA 12 LINE ha sido diseñado para 20 x 12 determinaciones.

La fecha de vencimiento de cada componente se reporta en las etiquetas respectivas, la fecha de vencimiento del kit completo se reporta en la etiqueta de la caja.

Luego de recibidos, todos los componentes de ANA 12 LINE deben mantenerse entre 2 – 8 °C, preferentemente en su caja original.

Luego de su apertura, todos los componentes del kit son estables por lo menos 2 meses, si se le provee el almacenamiento apropiado.

* * *

Preparación antes del uso

Dejar que los componentes alcancen la temperatura ambiente antes de empezar el ensayo.

Tocar las tiras solamente con pinzas plásticas.

Preparar una cantidad suficiente de solución tampón de lavado diluyendo 1:10 el tampón concentrado (1 + 9) con agua desionizada o destilada. Se necesitan 13 ml de tampón de lavado para cada tira. Por ejemplo, diluir 2 ml del concentrado con 18 ml de agua destilada.

La solución tampón de lavado preparada es estable entre 2 – 8 °C hasta por 30 días.

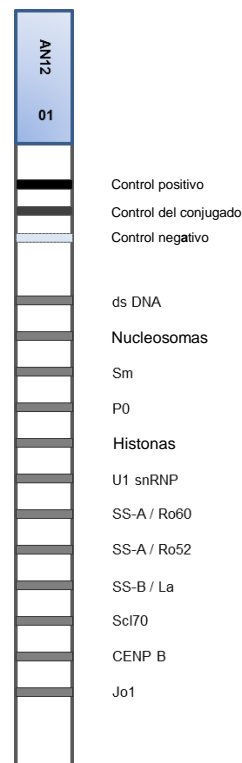
Los otros componentes son listo para usar y estables hasta la fecha de vencimiento.

¡Evitar la exposición de la solución de sustrato TMB a la luz!

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Evitar la variación de tiempo durante el pipeteo de los reactivos y las muestras.

1. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (TA, 18-25 °C) antes del uso. Mezclar suavemente sin producir espuma.
2. Colocar las tiras (A) en la canaleta respectiva con el lado reactivo hacia arriba. Dispensar 1,5 ml de diluyente (C) en cada canaleta.
3. Incubar durante 5-10 min bajo agitación.
4. Agregar 20 µl de suero o plasma del paciente en las canaletas respectivas.
5. Incubar a TA (18–25 °C) durante 30 min bajo agitación.
6. Decantar o aspirar, y a continuación lavar bajo agitación (3 veces x 3 minutos) cada canaleta con 1.5 ml de tampón de lavado (elaborada a partir de B). Descartar la solución de lavado invirtiendo lentamente la bandeja de incubación. Secar los bordes de la bandeja con papel absorbente para retirar la humedad remanente.
7. Agregar 1,5 ml de conjugado (D) a cada canaleta.
8. Incubar a TA (18 – 25 °C) durante 30 min bajo agitación.
9. Decantar o aspirar como en el punto 6. y a continuación lavar bajo agitación (3 veces x 3 minutos) cada canaleta con 1,5 ml de solución tampón (elaborada a partir de B).
10. Agregar 1,5 ml de sustrato (E) a cada pocillo.
11. Incubar a TA (18 – 25 °C) durante 10-12 min, bajo agitación.
12. Decantar o aspirar como en el punto 6. y lavar cada canaleta una vez por 3 min con 1,5 ml de tampón de lavado (elaborada a partir de B) para detener la reacción.
13. Secar las tiras: sacarlas de la bandeja y poner la tira sobre papel absorbente con el lado reactivo hacia arriba. Luego de aproximadamente 30 min. los resultados se interpretan con ayuda de la plantilla de interpretación.



Limitación del método

Muestras de Individuos sanos deberían resultar negativas para el ensayo ANA 12 LINE. Sin embargo, personas aparentemente sanas pueden dar resultados positivos.

Ningún diagnóstico clínico debe basarse únicamente en los resultados de un método para diagnóstico in vitro. El personal médico deberá considerar todos los resultados clínicos y de laboratorio para establecer un diagnóstico.

PROCESAMIENTO DE DATOS

Los resultados se deben interpretar solamente después de haber secado las tiras durante al menos 30 minutos.

Criterio de evaluación

En todos los casos los controles positivo y del conjugado deben ser positivos. La coloración de estas líneas asegura que la prueba ha sido ejecutada correctamente y que los componentes del kit no sean deteriorados. Si la línea del **control positivo** o del **control del conjugado** no muestra coloración, los resultados no pueden ser interpretados.

El **control negativo** muestra la magnitud de la afinidad en la prueba de anticuerpos no específicos presentes en la muestra. La coloración de esta línea sirve de control de corte para una decisión positivo/negativo.

Un **control de conjugado** positivo muestra el correcto funcionamiento del conjugado.

Las líneas de esta prueba son recubiertas con antígenos e identifican anticuerpos específicos de la muestra. La intensidad de coloración depende del título de cada específico anticuerpo en la muestra.

Resultado positivo:

Una muestra se considera positiva si la coloración de la línea del anticuerpo correspondiente es más intensa que la coloración del control negativo.

La intensidad de la coloración de la línea del control negativo depende de las condiciones durante la ejecución (p. ej. tiempo de incubación, temperatura, eficacia del lavado) y de la composición de cada muestra.

Resultado negativo:

Una muestra se considera negativa si la coloración de la línea del anticuerpo correspondiente es menos intensa o igual de la coloración de la línea del control negativo.

GA-Mdl-es-4289-v004-2018-01-24

DATOS CARACTERISTICOS DEL ENAYO

Sensibilidad

La sensibilidad relativa de la prueba ANA 12 LINE ha sido determinada analizando 53 muestras ANA positivas de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas en comparación con otro inmunoensayo lineal. La concordancia de cada parámetro es la siguiente:

dsDNA	100%
Nucleosomas	94%
Sm	100%
P0	100%
Histonas	87%
RNP	100%
SS-A/Ro60	100%
SS-A/Ro52	100%
SS-B/La	98%
Scl-70	96%
CENP-B	96%
Jo-1	100%

Especificidad

La especificidad diagnóstica fue determinada a partir de un estudio realizado con un grupo de donantes aparentemente sanos (n=72), y dio como resultado un valor de 98%.

ESQUEMA DE INCUBACIÓN

ANA 12 LINE (4289)

1.	Todos los reactivos y el número requerido de tiras deben alcanzar la temperatura ambiente (TA, 18-25 °C) antes del uso
2.	Colocar las tiras en la bandeja con el lado reactivo hacia arriba y dispensar 1,5 ml de diluyente (C) en las canaletas respectivas
3.	Incubar bajo agitación 5-10 min, TA (18 – 25 °C)
4.	Pipetear 20 µl de suero o plasma de los pacientes (dilución final 1 + 75) en las canaletas respectivas
5.	Incubar bajo agitación 30 min, TA (18 – 25 °C)
6.	Decantar, lavar las tiras (agitación) 3 x 3 min con 1,5 ml de solución de lavado (elaborada a partir de B)
7.	Pipetear 1,5 ml de conjugado (D) en las canaletas respectivas
8.	Incubar bajo agitación 30 min, TA (18 – 25 °C)
9.	Decantar, lavar las tiras (agitación) 3 x 3 min con 1,5 ml de solución de lavado (elaborada a partir de B)
10.	Pipetear 1,5 ml de sustrato (E)
11.	Incubar mientras se agita 10-12 min, TA (18 – 25 °C)
12.	Decantar, lavar las tiras para detener la reacción 1 x 3 min con 1,5 ml de solución de lavado (elaborada a partir de B)
13.	Poner la tira sobre papel absorbente con el lado reactivo hacia arriba. Luego de aproximadamente 30 min. las tiras serán lista para la interpretación

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- **Este kit es para uso in vitro únicamente.** Se deben seguir las instrucciones cuidadosamente. GA GENERIC ASSAYS GmbH y sus distribuidores autorizados no serán responsables por daños ocasionados indirectamente o a consecuencia de cambios o modificaciones del procedimiento indicado. La prueba debe ser llevada a cabo únicamente por personal técnico entrenado.
- Las fechas de vencimiento indicadas en los respectivos rótulos deben ser respetadas. Del mismo modo, la estabilidad que se indique para los reactivos reconstituídos debe ser tenida también en cuenta.
- No usar o mezclar reactivos de lotes diferentes.
- No usar reactivos de otros fabricantes
- Evitar variaciones de tiempo durante el pipeteo de estándares, muestras y reactivos.
- Mientras no sean usados, todos los reactivos deben ser mantenidos a 2-8 °C en el envase original.
- Algunos de los reactivos contienen pequeñas cantidades de Neolone™ M10 (< 1,0 % p/v) como conservantes. Se debe evitar salpicaduras y contacto con piel y mucosas.
- Los materiales derivados de fluidos u órganos humanos usados en la elaboración de este kit han sido evaluados, y los resultados encontrados han sido negativos para HBsAg y VIH, así como también para anticuerpos contra HCV. No obstante, ninguna prueba conocida garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, es necesario manipular los componentes del kit, así como las muestras de los pacientes como potencialmente infecciosos.
- Debido a que esta prueba puede contener materiales potencialmente peligrosos, deben tomarse las siguientes precauciones:
 - No fumar, comer o beber mientras se maneja el material
 - Usar guantes protectores,
 - Nunca pipetear con la boca,
 - Secar las salpicaduras rápidamente, lavando la zona afectada con un desinfectante.
- En todos casos, para el utilizo de este kit, las buenas prácticas de laboratorio (BLP) deberían ser aplicadas junto con todas las regulaciones generales e individuales.