

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS es un ensayo cualitativo selectivo diseñado para detectar anticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (anti-ENA) en suero humano. Cuando se realiza de acuerdo con las instrucciones adjuntas, este sistema de pruebas es capaz de detectar todos los anti-ENA que se suelen analizar de forma sistemática, como los anticuerpos frente a Jo-1, Sm, Sm/RNP, SSA, SSB y Scl-70. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

En años recientes, se ha hecho evidente que los autoanticuerpos contra un número de constituyentes nucleares han probado ser útiles en el diagnóstico de varias enfermedades del tejido conectivo. El autoanticuerpo Jo-1 es uno de una familia de autoanticuerpos característicos observados en los pacientes con miositis (19). Los científicos los encuentran específicamente en pacientes con miositis, y los asocian con una alta incidencia de enfermedad pulmonar intersticial concomitante (10). Los médicos consideran que los anticuerpos dirigidos contra el marcador Sm son un criterio diagnóstico para el lupus eritematoso sistémico (LES) debido a su alta especificidad por los pacientes con LES (1, 2). La sola presencia de un nivel elevado de anticuerpos anti-RNP se considera diagnóstica de enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y generalmente se asocia con una enfermedad de curso más benigno (3), mientras que se pueden observar niveles bajos de anticuerpos anti-RNP, conjuntamente con otros autoanticuerpos, en el suero de pacientes con esclerosis sistémica progresiva, Síndrome de Sjögren, y artritis reumatoide. La presencia de anticuerpos anti-RNP en el suero de pacientes con LES generalmente se asocia con una incidencia menor de daño renal y una enfermedad de curso más benigno. Por el contrario, los pacientes con anticuerpos anti-Sm experimentan una frecuencia más elevada de complicaciones renales y del sistema nervioso central (4). Se han llevado a cabo estudios en los que se han observado autoanticuerpos dirigidos contra SSA y SSB en pacientes con LES (5, -6), y enfermedad de Sjögren (7, -9). Los anticuerpos anti-SSA frecuentemente están presentes en el suero de pacientes con LES que son negativos para AAN, tales como los que padecen lupus eritematoso cutáneo subagudo (12), un síndrome parecido al lupus asociado con una deficiencia homocigota de C2 (13), y en un subgrupo de pacientes que carecen de anticuerpos anti-ADNdf (11). Los anticuerpos anti-Scl-70 son altamente específicos para la esclerodermia (11). Las investigaciones también muestran estos anticuerpos en una minoría de los pacientes con LES. Los pacientes con esclerodermia, positivos para Scl-70 tienden a tener una enfermedad de curso más severo, más complicaciones de órganos internos y complicaciones considerablemente más difusas que limitadas al área de la piel (14). Los científicos raramente encuentran anticuerpos anti-Scl-70 en otras enfermedades autoinmunes, y por lo tanto, su detección en un paciente con inicio reciente de fenómeno de Raynaud, es altamente significativa (15). La Tabla 1 resume los diferentes autoanticuerpos mencionados anteriormente, relacionados con la enfermedad a la cual se asocian (16):

Anticuerpo	Estado de la enfermedad	% de frecuencia relativa de detección de anticuerpo
Anti-Jo-1	Miositis	25 - 44% (19)
Anti-Sm	LES	30*
Anti-RNP	MCTD, 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.

Hasta hace poco, las pruebas de autoanticuerpos se hacían individualmente por inmunofluorescencia indirecta, difusión en gel de Ouchterlony, hemaglutinación, radioinmunoensayo o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). A diferencia de varios otros sistemas, la metodología de ELISA ofrece una evaluación sensible, objetiva y rápida de especímenes, y por lo tanto es adecuada para la detección selectiva de un gran número de muestras obtenidas para la detección de anticuerpos frente al ENA. Se desconoce la etiología exacta de las enfermedades autoinmunes, y no está claro el papel específico que desempeñan los autoanticuerpos en el inicio de varias enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. El sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS ofrece un procedimiento de prueba eficiente para la evaluación en el laboratorio de pacientes con sospecha de diversas enfermedades del tejido conectivo mediante la asociación y frecuencia de detección de estos anticuerpos.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos del tipo IgG frente a AAN Screen en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno del ENA. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo contra el ENA inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno del ENA. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Fc) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL SPE	6.	Diluyente SAVE Diluent®: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato, (pH 7,2 ± 0,2). Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.

SOLN	TMB
------	-----

7. TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.

SOLN	STOP
------	------

8. Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H₂SO₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.

WASHBUF	10X
---------	-----

9. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). **NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.**

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVE Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

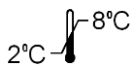
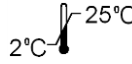
PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir 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 inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. 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).
5. 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.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente SAVE Diluent®, los controles, y el calibrador 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 las soluciones que contengan azida de sodio.
8. La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
15. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
22. Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVe Diluent® sin abrir
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C
	Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C.
	Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS 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): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- 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 la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (17, 18). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados 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 tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a 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 (21).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVe Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente SAVe Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 - Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
- Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.

14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. \longrightarrow Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. \longrightarrow Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. \longrightarrow Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	<u>Intervalo de DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
- b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
- c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al Calibrador incluido en este Sistema de prueba se le ha asignado un Factor de Corrección para la generación de Valores Índice. Basándose en pruebas de muestras de estado normal y de enfermedad, el fabricante ha determinado un Valor Unitario máximo y se ha correlacionado con el Calibrador.

1. Cálculos

- a. *Factor de corrección:* El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. *Límite de referencia de la DO:* Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)
- c. *Valores índice/cocientes de DO:* Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo: DO media del calibrador	=	0,793
Factor de corrección (FC)	=	0,25
Límite de referencia de la DO	=	0,793 x 0,25 = 0,198
DO de muestra desconocida	=	0,432
Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	0,432/0,198 = 2,18

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	<u>Valor índice/cociente de DO</u>
Muestras negativas	≤0,90
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	≥1,10

- a. Un cociente de DO menor o igual a 0,90 se interpreta como negativo para anticuerpos de tipo IgG anti-ENA.
- b. Un cociente de DO mayor o igual a 1,10 se interpreta como positivo para anticuerpos de tipo IgG anti-ENA.
- c. Vuelva a analizar por duplicado las muestras con valores del coeficiente de DO comprendidos en el intervalo dudoso (0,91 – 1,09). Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la prueba de las muestras dudosas utilizando un procedimiento serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS es una herramienta para el diagnóstico, pero no es en sí una prueba diagnóstica. Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
2. Se pueden encontrar resultados positivos de anticuerpos contra ENA en personas aparentemente sanas. Por lo tanto, es imperativo que los resultados sean interpretados por una autoridad médica que tenga en cuenta la situación clínica del paciente.
3. El sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS no identificará el tipo específico de anti-ENA que está presente en una muestra positiva. Para detectar los autoanticuerpos individuales de las muestras positivas, éstas deben analizarse utilizando el sistema de pruebas específico para autoanticuerpos.

RESULTADOS ESPERADOS

El valor esperado para un paciente normal es un resultado negativo. El número de reactivos y el grado de reactividad dependen de parámetros tales como la población que está siendo estudiada, el tratamiento, etc. Cada laboratorio debe establecer sus propios valores esperados basados en las muestras que analiza típicamente. Con respecto a la enfermedad y porcentaje de reactividad, la Tabla 1 en la sección Importancia y aspectos generales de este prospecto muestra la frecuencia relativa de la actividad de autoanticuerpo para varios trastornos reumáticos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo:

En una investigación clínica, se analizaron 176 muestras de suero empleando el sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS y otros diversos sistemas de pruebas ELISA comerciales. Técnicos evaluaron la especificidad utilizando 61 muestras de personas normales, asintomáticas del sudeste de los Estados Unidos, y la sensibilidad utilizando 115 muestras de suero de personas enfermas del noreste de los Estados Unidos. Los resultados del estudio se resumen en las Tablas 1 a 4 siguientes.

Tabla 1: Evaluación de las características de especificidad (N=61 sueros de donantes normales)

		Sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso ^a	Total
Prueba ELISA comercial	Positivo	0	20 ^b	0	20
	Negativo	0 ^c	41	0	41
	Dudoso ^a	0	0	0	0
	Total	0	61	0	61

^a Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos.

^b Se confirmó que las veinte muestras eran negativas para AAN.

^c Representa muestras discrepantes.

Especificidad relativa = $41/41 = 100\%$.

Tabla 2: Evaluación de las características de sensibilidad (N=115 muestras de personas enfermas)

		Sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso ^a	Total
Prueba ELISA comercial	Positivo	77	6 ^b	0	83
	Negativo	3	29	0	32
	Dudoso*	0	0	0	0
	Total	80	35	0	115

^a Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos.

^b Representa las muestras discrepantes (véase la Tabla 3).

Sensibilidad relativa = $77/83 = 93\%$.

Tabla 3: Resumen de las muestras discrepantes; resultados de la prueba ELISA

Número de muestra	Resultado para ELISA de ZEUS	Resultado para otros ELISA	Resolución*
78	0,444/-	RNP +	RNP neg. confirmado
83	0,562/-	Jo-1 +	Sin resolver
85	0,569/-	SSA +	SSA neg. confirmado
87	0,597/-	SSA +	SSA neg. confirmado
89	0,687/-	RNP +	RNP neg. confirmado
95	0,777/-	Sm, RNP, SSA +	ENA neg. confirmado

* Confirmado utilizando uno o todos los sistemas de pruebas siguientes:

1. Sistema de pruebas IFA ANA HEp-2 de ZEUS
2. Sistema de pruebas Poly-ENA® Immunodiffusion de ZEUS
3. Sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS

2. Reproducibilidad:

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento número EP5-T2: *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition (Evaluación del Comportamiento de la Precisión de Instrumentos de Química Clínica - Segunda Edición)*, publicado por el Comité Nacional para los Estándares del Laboratorio de Química Clínica (NCCLS, por sus siglas en inglés). Se analizaron seis muestras, dos de las cuales eran muy claramente positivas, dos eran moderadamente positivas y dos negativas. Cada muestra fue analizada por duplicado, dos veces por día (mañana y tarde), en cada día. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de las pruebas de reproducibilidad

ID	Cociente medio	SWR ^a	ST ^b	Días de prueba	% CV	Observaciones totales
1	12,16	0,58	1,12	20	9,17	80
2	9,72	0,78	1,05	20	10,80	80
3	4,48	0,54	0,56	20	12,44	80
4	4,21	0,53	0,73	19	17,39	76
5	0,41	0,07	0,15	19	N/A	76
6	0,20	0,08	0,10	18	N/A	72

^a Estimación puntual de la desviación estándar de la precisión dentro de un mismo ensayo.

^b Estimación del punto de la desviación estándar de la precisión total.

3. Reactividad cruzada:

Se analizaron muestras negativas para AAN, mediante HEp-2 IFA, y negativas para el anticuerpo de tipo IgG contra varios antígenos, como EBV-VCA, EBNA, HSV-1, HSV-2, CMV, rubeola y/o toxoplasmosis, para determinar la reactividad cruzada potencial utilizando el sistema de pruebas ELISA ENA Screen de ZEUS. Todas las muestras fueron negativas en la prueba de ELISA, lo cual indica que el potencial de reactividad cruzada con dichos anticuerpos no es probable, y por consiguiente no debería afectar a los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

1. Tan EM, Cohen AS, Fries J, *et al*: Special Article: The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271-1277, 1982.
2. Beufels M, Kouki F, Mignon F, *et al*: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 74:201-215, 1983.
3. Sharp GC, Irwin WS, Tan EM, Holman H: Mixed connective tissue disease. An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52: 148-159, 1972.

4. Winfield JB, Brunner CB, Koffler DB: Serological studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
5. Tan EM, Kunkel HG: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
6. Maddison PJ, Mogavero H, Provost TT, Reichlin M: The clinical significance of autoantibodies to soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* 6:189-192, 1979.
7. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117, 1969.
8. Alexander E, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB: The Ro(SSA) and La(SSB) antibody system and Sjögren's syndrome. *J. Rheum.* 9:239-246, 1982.
9. Alspaugh MA, Talal N, and Tan E: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
10. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, *et al*: Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Quart. J. Med.* 77:1019-1038, 1990.
11. Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93-151, 1989.
12. Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam JN: Subacute cutaneous lupus erythematosus: A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch. Derm.* 115:1409-1415, 1979.
13. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti Ro (SSA) antibodies. *Arth. Rheum.* Vol. 26, No. 10:1279-1282, 1983.
14. LeRoy EC, Black CM, Fleishmajer R, *et al*: Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:202-205, 1988.
15. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, *et al*: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase 1 antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 34:68-77, 1991.
16. Mongey AB, Hess EV: Antinuclear antibodies and disease specificity. *Advances in Int. Med.* 36 (1): 151-169, 1989.
17. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
18. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for clinical Laboratory Standards.
19. Sturgess A: Review; Recently characterized autoantibodies and their clinical significance. *Aust. N.Z., J. Med.* 22:279-289, 1992.
20. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Fed. Register* 56:64175-64182, 1991.
21. 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, Inc.

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 ELISA y SAVE Diluent* son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Sistema de pruebas ENA Screen

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.

©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

