

**APLICACIÓN**

El sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS es un inmunoensayo semicuantitativo para la detección de anticuerpos de tipo IgG frente a Jo-1, Sm, Sm/RNP, SSA(Ro), SSB(La) y Scl-70 en suero humano. Cuando se realiza conforme a estas instrucciones, los resultados de este perfil de autoanticuerpos pueden ayudar al diagnóstico y tratamiento de trastornos autoinmunes del tejido conectivo. 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 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.

La frecuencia relativa de estos autoanticuerpos asociados con LES y otras enfermedades del tejido conectivo, ya sea individualmente o como múltiples autoanticuerpos, requiere una evaluación del perfil de autoanticuerpos del suero de cada paciente para obtener el mayor grado de relevancia clínica en el procesamiento en laboratorio de estos tipos de pacientes. 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). 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 Profile-6 de ZEUS ofrece un procedimiento de prueba eficiente para la evaluación en el laboratorio de pacientes con 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 Profile-6 de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra distintos autoantígenos en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígenos inmovilizados. 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 incuban la placa. El conjugado reaccionará con los anticuerpos inmovilizados 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®.**

<b>PLATE</b>	1. Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno desactivado. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
<b>CONJ</b>	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.
<b>CONTROL +</b>	3. Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
<b>CAL</b>	4. Calibrador (suero humano): dos viales de 1,0 ml con tapa roja plegable (lío-filizado). Contiene conservantes. Reconstituya el contenido del vial con 1,0 ml de agua destilada o desionizada. Tras la reconstitución, el calibrador está listo para su uso. <b>No lo diluya más antes de su uso.</b>
<b>CONTROL -</b>	5. Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
<b>DIL SPE</b>	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. <b>NOTA: El diluyente SAvE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.</b>
<b>SOLN TMB</b>	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
WASHBUF	10X

8. Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.

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.

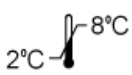
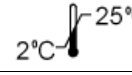
**PRECAUCIONES**

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 descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. 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.
27. Reconstituya completamente el calibrador antes de realizar la prueba. Una reconstitución inapropiada o inadecuada dará lugar a resultados erróneos.

**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
	Calibrador reconstituido no utilizado, hasta 30 días.
	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.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Para cada muestra se necesitará una tirilla de antígeno de perfil de 1x8. Incluya el control positivo, el control negativo y el calibrador cada vez que se realiza el ensayo. 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.
- Prepare una dilución al 1:21 de los controles positivo y negativo, y de cada uno de los sueros de paciente.
  - Añada 50 µl de cada muestra, el control positivo y el control negativo en tubos distintos. Añada 1000 µl de diluyente SAVe Diluent® a cada tubo. Mezcle bien el contenido de cada tubo. El diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.
  - Añada 100 µl de diluyente SAVe Diluent® a cada pocillo de la fila A.
  - Con la ayuda de una pipeta multicanal, cargue los controles, el calibrador y las muestras de paciente, tal como se indica más adelante. Cargue 100 µl en cada pocillo. El calibrador reconstituido está listo para cargar, **no lo diluya**.

Antígeno	Fila	Columna					etc.
		1	2	3	4	5	
Mezcla de antígenos	A	Diluyente	Diluyente	Diluyente	Diluyente	Diluyente	
Jo-1	B	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
Sm	C	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
Sm/RNP	D	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
SSA	E	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
SSB	F	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
Scl-70	G	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	
Control de antígeno	H	Control negativo	Control positivo	Calibrador	Prueba 1	Prueba 2	

- 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 5.
- 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.
- 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.

## CONTROL DE CALIDAD

- Cada vez que realice la prueba, analice el control positivo, el control negativo y el calibrador. Para cada tirilla de perfiles es preciso incluir un blanco de diluyente (fila A) y un blanco de antígeno de control (fila H). El blanco de diluyente mide la interacción no específica entre el conjugado y los autoantígenos. El pocillo revestido con antígeno de control calcula la interacción no específica entre el anticuerpo del paciente y el antígeno de control.

2. Consulte la lista de componentes incluida. En dicha hoja se describen las especificaciones concretas de cada lote para el calibrador. Si el calibrador ofrece valores fuera de los márgenes aceptables, los resultados no se considerarán válidos y los resultados del paciente no podrán comunicarse.
3. Los controles positivo y negativo deben cumplir las siguientes especificaciones:
  - a. El control positivo debe ser >180 AAU/ml
  - b. El control negativo debe ser < 150 AAU/ml
  - c. El control positivo y el control negativo deben ser  $\geq 2,00$ .
4. Si los controles del ensayo no cumplen las especificaciones indicadas, el ensayo no se considerará válido. En este caso, no comunique los resultados del paciente.
5. Calcule la media de los pocillos de control del conjugado (fila A). Este valor debe ser inferior a 0,200. Una DO media alta del control del conjugado podría indicar un lavado incorrecto, una baja calidad del agua o la contaminación de los reactivos. La variabilidad entre los distintos pocillos indica un pipeteado incorrecto y/o que los pocillos no se han lavado de la misma forma.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 1. Cálculos

- a. **Determinación de la densidad óptica (DO) específica del autoantígeno:** Los controles, el calibrador y las muestras de prueba se cargan en el pocillo revestido con antígeno de control (fila H). Para preparar el pocillo revestido con antígeno de control, se recubre y se bloquea el plástico con soluciones que **no** contengan autoantígenos. Por consiguiente, el pocillo revestido con antígeno de control permite calcular la **absorbencia no específica** de cada muestra. La absorbencia específica del autoantígeno puede representarse como la diferencia de densidad óptica entre el pocillo revestido con antígeno y el pocillo revestido con antígeno de control.

**Ejemplo:** Muestra de prueba A, DO del pocillo de control (fila H) = 0,175  
 Muestra de prueba A, DO del pocillo SSB (fila F) = 1,563  
 DO específica de SSB = 1,563 – 0,175 = 1,388

Utilizando el respectivo pocillo revestido con antígeno de control de cada calibrador, control y muestra, determine la DO específica de cada autoantígeno. No reste la DO del antígeno de control de la DO del pocillo de control del conjugado.

- b. **Calibrador:** Basándose en pruebas de muestras de estado normal y de enfermedad, ZEUS Scientific ha determinado un valor máximo de unidades de autoanticuerpos (AAU) normales y ha relacionado dicho valor con el calibrador. El calibrador permite calcular el valor de unidad de las muestras de cada autoantígeno y corregir las pequeñas variaciones cotidianas en los resultados de las pruebas. Se determina el valor de las unidades de cada autoanticuerpo de cada lote de componentes del kit, y este valor se imprime en la lista de componentes.
- c. **Conversión de la densidad óptica a AAU/ml:** La conversión de la DO específica del autoantígeno a un valor en unidades (AAU/ml) puede representarse mediante la siguiente ecuación: Muestra de prueba AAU/ml = (A x B)/C

**Donde:** AAU/ml = Valor de unidad desconocido que se desea determinar  
 A = DO de la muestra analizada  
 B = Valor de unidad del calibrador para el autoantígeno en cuestión (AAU/ml).  
 C = DO del calibrador.

**Ejemplo:** DO específica de la muestra analizada para SSA = 0,946  
 DO específica del calibrador para SSA = 0,435  
 Valor de unidad del calibrador para SSA = 155 AAU/ml  
**Muestra de prueba AAU/ml = (0,946 x 155) / 0,435**  
**Muestra de prueba = 337 AAU/ml para anti-SSA**

### 2. Interpretación de los resultados:

ZEUS Scientific, Inc. utilizó 152 muestras de donantes sanos normales y 185 muestras de personas enfermas con el fin de establecer las siguientes pautas para la interpretación de los resultados del paciente:

< 150 AAU/ml - Negativo  
 150 - 180 AAU/ml - Dudoso  
 >180 AAU/ml - Positivo

Utilice las pautas siguientes para evaluar o interpretar las muestras de paciente. Vuelva a analizar por duplicado las muestras con valores de unidad comprendidos en el intervalo dudoso (150 – 180). 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. Unos niveles elevados de autoanticuerpos en cualquiera de los autoantígenos de perfil puede ser indicativo de un trastorno reumático específico. La sección Importancia y aspectos generales de este prospecto describe algunas de las enfermedades más habituales asociadas con unos niveles elevados de autoanticuerpos. **NOTA: al interpretar el resultado de anti-Sm/RNP para determinar la actividad potencial de anti-RNP (solamente), debe tenerse en cuenta el resultado de anti-Sm y de anti-Sm/RNP simultáneamente.** A continuación se muestran tres ejemplos de posibles situaciones:

- a. Resultado de anti-Sm = 80, y resultado de anti-Sm/RNP = 986 AAU/ml. El paciente muestra unos niveles importantes de anti-RNP.
- b. Resultado de anti-Sm = 493 AAU/ml, y resultado de anti-Sm/RNP = 1.139 AAU/ml. El paciente muestra unos niveles importantes de ambos autoanticuerpos.
- c. Resultado de anti-Sm = 37 AAU/ml, y resultado de anti-Sm/RNP = 63 AAU/ml. El paciente es negativo para ambos autoanticuerpos.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados del sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS.
2. Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.

## 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:

Se ha realizado un estudio comparativo para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS, con otros diversos sistemas de prueba ELISA comerciales utilizando 337\* muestras de suero; 152 muestras de donantes normales del noreste y sudeste de los Estados Unidos y 185 muestras almacenadas de estado de enfermedad previamente caracterizadas con respecto a actividad de autoanticuerpos. Los resultados de la investigación se resumen en las tablas 1 y 2 siguientes: \*La población total analizada para la detección de anti-Jo-1 fue de 126; 64 muestras de donantes normales y 62 muestras de repositorio de personas enfermas.

**Tabla 1: Sensibilidad relativa, muestras de personas enfermas**

Autoantígeno	Reactivos para ELISA de ZEUS	Reactivos para ELISA comercial	Discrepantes	Reactivos tras la resolución de los discrepantes	Sensibilidad
Jo-1	8	8	0	8	8/8 = 100,0%
Sm	13	16	3	13	13/13 = 100,0%
Sm/RNP	46	58	11	50	46/50 = 92,0%
SSA	56	74	18	57	56/57 = 98,2%
SSB	28	34	6	29	28/29 = 96,6%
Scl-70	8	17	9	8	8/8 = 100,0%

**Tabla 2: Especificidad relativa; muestras de donantes normales**

Autoantígeno	No reactivos para ELISA de ZEUS	No reactivos para ELISA comercial	Discrepantes	No reactivos tras la resolución de los discrepantes	Especificidad
Jo-1	64	64	0	64	64/64 = 100,0%
Sm	136	137	1	137	136/137 = 99,3%
Sm/RNP	141	144	3	144	141/144 = 97,9%
SSA	146	146	0	146	146/146 = 100,0%
SSB	147	147	0	147	147/147 = 100,0%
Scl-70	151	151	0	151	151/151 = 100,0%

**2. Reproducibilidad:**

Para evaluar las variaciones intraensayo e interensayos del procedimiento de prueba, se analizó once veces al día, durante tres días, una muestra positiva fuerte, una muestra positiva baja y una muestra negativa para todos los autoantígenos. Se calcularon el valor unitario medio, la desviación estándar y el porcentaje de CV para cada muestra. Los resultados de este estudio se ilustran en las Tablas 3 a 6 siguientes:

**Tabla 3: Reproducibilidad intraensayo, muestra "positiva alta": sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS**

Antígeno	Día 1			Día 2			Día 3		
	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV
Jo-1	459	15	3	391	22	6	385	18	5
Sm	576	71	12	690	71	10	702	29	4
Sm/RNP	535	73	14	426	73	17	608	76	12
SSA	818	62	7	652	68	10	779	52	7
SSB	1022	120	12	881	65	7	987	67	7
Scl-70	669	95	14	626	65	10	726	93	3

**Tabla 4: Reproducibilidad intraensayo, muestra "positiva baja": sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS**

Antígeno	Día 1			Día 2			Día 3		
	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV
Jo-1	232	11	5	189	9	4	189	8	4
Sm	460	43	9	587	52	9	392	28	7
Sm/RNP	184	34	18	246	34	14	216	29	13
SSA	199	26	13	231	38	17	189	22	12
SSB	178	29	16	167	20	12	210	25	12
Scl-70	231	21	9	214	10	5	270	21	8

**Tabla 5: Reproducibilidad intraensayo, muestra negativa: sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS**

Antígeno	Día 1			Día 2			Día 3		
	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV
Jo-1	5	2	N/A	5	1	N/A	4	1	N/A
Sm	12	3	N/A	8	3	N/A	7	1	N/A
Sm/RNP	26	4	N/A	29	9	N/A	22	6	N/A
SSA	27	4	N/A	14	6	N/A	13	5	N/A
SSB	2	2	N/A	1	1	N/A	1	1	N/A
Scl-70	5	2	N/A	5	3	N/A	3	2	N/A

**Tabla 6: Reproducibilidad intraensayo: sistema de pruebas ELISA ENA Profile-6 de ZEUS**

Antígeno	Positivo alto			Positivo bajo			Negativo		
	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV
Jo-1	412	38	9	203	23	11	5	2	N/A
Sm	656	85	13	479	93	19	9	3	N/A
Sm/RNP	532	97	18	216	42	19	26	7	N/A
SSA	750	95	13	207	35	17	18	9	N/A
SSB	963	108	11	185	32	17	1	1	N/A
Scl-70	674	97	14	238	30	13	5	2	N/A

**3. Reactividad cruzada:**

Se analizaron muestras negativas para AAN, mediante IFA HEP-2, 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 Profile-6 de ZEUS. Todas las muestras analizadas 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 E, Cohen A, 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.* In Press.
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 Procedure H18. Approved guideline.
18. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
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 (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 21CFR 1910.1030.
21. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4<sup>th</sup> 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](http://www.zeusscientific.com)

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

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](mailto:support@zeusscientific.com).

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

©2020 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

