

# **DETECCIÓN SELECTIVA DE ENA EN POCILLO ÚNICO CON RELISA® PARA ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS NUCLEARES EXTRAÍBLES**

**Para uso diagnóstico in vitro**

**Para El Uso Profesional**

**Número de catálogo: 7096-10 (96 pocillos) y 7696-10 (576 pocillos)**

*USO PREVISTO: Se trata de un sistema de análisis inmunoenzimático (EIA) para la detección de anticuerpos contra los antígenos nucleares extraíbles Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y and Jo-1 en suero humano. Los resultados de esta prueba se pueden utilizar como complemento del diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias.*

## **RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**

Los anticuerpos anti-ENA se han asociado a diversos síndromes autoinmunitarios, y parecen tener un significado diagnóstico y/o pronóstico en la esclerosis sistémica (1, 2), las enfermedades mixtas del tejido conjuntivo (3-5), el síndrome de Sjögren (6, 7), la polimiositis (8), la dermatomiositis (9), el lupus eritematoso sistémico (5) y la artritis reumatoide (10). Se ha utilizado el análisis de anticuerpos antinucleares (ANA) para hacer una detección selectiva de estos anticuerpos, pero en dicho análisis no se especifica el anticuerpo, y algunos anticuerpos contra determinados ENA no dan positivo en el análisis de ANA (11, 12). Por eso es muy recomendable realizar una evaluación secundaria de confirmación de los anticuerpos anti-ENA (13).

El antígeno Sm (Smith) fue identificado en 1966 por Tan y Kunkel como una glucoproteína no histona soluble en suero salino, que no depende del ADN ni del ARN para su poder antigénico (14). Se considera que los anticuerpos contra el antígeno Sm son marcadores serológicos específicos, debido a su elevado grado de especificidad por el lupus eritematoso sistémico (LES). Estos anticuerpos se observan en hasta el 30% de los pacientes con LES, y se han asociado a nefropatías activas y a cerebritis (15-17).

En el suero de pacientes con LES es frecuente encontrar anticuerpos anti-Sm junto con anticuerpos anti-U1-RNP (18, 19). Al contrario que los anticuerpos anti-Sm, los anticuerpos anti-RNP no se consideran marcadores serológicos específicos, pues se encuentran en pacientes con diversas enfermedades reumáticas como LES, esclerodermia, síndrome de Sjögren y artritis reumatoide. No obstante, los niveles elevados de anticuerpos anti-RNP presentan una elevada asociación a un síndrome intermedio denominado enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC). Los pacientes con EMTC se caracterizan por una combinación de datos clínicos que se observan en el LES, la esclerodermia y la polimiositis. A menudo, estos pacientes demuestran una buena respuesta al tratamiento con corticosteroides, y presentan una incidencia menor de enfermedades renales que los pacientes con LES (20, 21).

Originalmente, SSA y SSB fueron descritos como antígenos nucleares de proteínas del ARN en pacientes con síndrome de Sjögren (6, 7). Ro y La fueron descritos como antígenos citoplásmicos de proteínas del ARN en pacientes con LES (22, 23). En la actualidad se suele aceptar que SSA y Ro son análogos, que SSB y La también lo son, y que estos antígenos se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma. Se encuentran anticuerpos contra SSA/Ro solo o contra SSA/Ro y SSB/La en hasta el 62% de los pacientes con lupus cutáneo subagudo (24), y en el 85% de los pacientes con síndrome de Sjögren que presentan vasculitis (25).

Se observan anticuerpos contra SSA/Ro solo en pacientes con déficit homocigótico de la fracción C2 del complemento (26), en pacientes con cirrosis biliar primaria que desarrollan síndrome de Sjögren (27) y en hasta dos tercios de los pacientes con "LES sin ANA" (28).

El auto-antígeno SSA/Ro es un complejo de la proteína Ro60 y de la proteína Ro52 con ribonucleoproteínas pequeñas. Este complejo en ocasiones es llamado el "complejo SSA/Ro hY-RNA" y también incluye la proteína SSB/La. Ro60 esta altamente relacionada con el complejo SSA/Ro hY-RNA, pero Ro52 esta solamente asociada de forma leve con este complejo (29).

Se ha identificado que el antígeno Scl-70 es una enzima celular, la ADN topoisomerasa I (30). Se han observado anticuerpos anti-Scl-70 en hasta el 56% de los pacientes con esclerosis sistémica progresiva, sobre todo en el subgrupo que presenta esclerodermia difusa (31). Se considera que estos autoanticuerpos son marcadores de la ESP, pues no se observan en otras enfermedades del tejido conjuntivo.

Los anticuerpos anti-Jo-1, que es la enzima celular histidil ARNt sintetasa, se encuentran en el 25-30% de los pacientes con polimiositis o dermatomiositis, pero no en otras miopatías (11, 32). También se ha demostrado que los anticuerpos anti-Jo-1 presentan una elevada asociación con las neumopatías intersticiales que se observan en asociación a las miositis (32).

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Se trata de un EIA cualitativo indirecto. La superficie de los micropocillos ha sido recubierta con una mezcla de antígenos nucleares extraíbles purificados en función de su afinidad y estabilizados, que actúa como antígeno en este sistema. Se disponen muestras diluidas de los pacientes en los micropocillos, y se incuban permitiendo que los anticuerpos específicos de la muestra reaccionen con el antígeno de la fase sólida. Tras lavar para retirar el anticuerpo no ligado y otras proteínas del suero, se incuban los pocillos con anticuerpos humanos de cabra, marcados con peroxidasa de rábano. El preparado de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano que se incluye en sistema de evaluación es específico de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG humana.

Tras la incubación con los conjugados de peroxidasa de rábano, y si los resultados son positivos, se forma un complejo estable con tres partes. Este complejo esta compuesto por anticuerpo antihumano conjugado con peroxidasa de rábano unido al anticuerpo anti-ENA humano, unido a su vez al antígeno estabilizado en la superficie de plástico.

Tras otro paso de lavado se detecta el complejo añadiendo una solución de tetrametilbenzidina (TMB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato cromógeno. El grado de aparición del color en cada pocillo es proporcional a la concentración de anticuerpos anti-ENA en cada muestra de suero. Cada micropocillo es analizado en un espectrofotómetro a 450 nm.

## COMPONENTES DEL SISTEMA - MATERIALES SUMINISTRADOS

**Conservación:** Todos los componentes deben conservarse en refrigerador a 2-10°C. No congelar.

**Estabilidad:** Todos los componentes son estables al menos durante 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice los componentes pasada la fecha de caducidad.



### REACTIVOS



**Tiras de micropocillos recubiertas con antígeno nuclear extraíble **PLATE**:** Número de catálogo 7008-10. Contiene un soporte de micropozos con doce tiras de ocho pozos cada una recubiertas con una mezcla de siete antígenos nucleares extraíbles purificados en función de su afinidad y estabilizados (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Scl-70 y Jo-1). Estas tiras son de color pardo. Si se necesitan menos de 8 pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito desecante, cerrandolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerandolo hasta un máximo de 45 días.

**Disolvente de muestras **SOLN|DIL**:** Número de catálogo 7100 (100 ml). Disolvente para muestras tamponado patentado, para disolver las muestras de los pacientes.

**Reactivo enzimático para anticuerpos – específico de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG humana**

****CONJ|HRP**:** Número de catálogo 7009-10 (14 ml). IgG antihumana (L y P), conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Listo para usar.

**Solución de sustrato** **SOLN|SUB**   : Número de catálogo 7035 (14 ml). Solución de sustrato enzimático específica de HRP, que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Listo para usar. **PELIGRO:** Inflamable. Este reactivo contiene menos de 25% de metanol y acetona. Manténgalo fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico.

**Reactivo de parada** **SOLN|STOP**   : Número de catálogo 7033 (14 ml). Reactivo de parada patentado para los sistemas de análisis EIA de Immuno Concepts. Listo para usar. **PELIGRO:** Corrosivo. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

**Suero calibrador de ENA** **CAL**: Número de catálogo 7026-10 (2 ml). Suero humano que contiene anticuerpos contra uno o más de los antígenos nucleares extraíbles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y/o Jo-1. El valor de la prueba para este suero figura en la etiqueta del vial. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control positivo de ENA** **CONTROL|+**: Número de catálogo 7021-10 (2 ml). Suero humano positivo que contiene anticuerpos contra uno o más de los antígenos nucleares extraíbles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y/o Jo-1. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control negativo para ENA** **CONTROL|-**: Número de catálogo 7031 (2 ml). Suero de control negativo humano que no contiene anticuerpos contra los antígenos Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y Jo-1. Este suero se presenta en dilución de trabajo, listo para usar.

**Control positivo no diluido de ENA opcional** **OPT+**: Número de catálogo 7022-10 (0,25 ml). Suero de control positivo humano que contiene anticuerpos contra uno o más de los antígenos nucleares extraíbles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y/o Jo-1. Este control positivo debe ser tratado con suero no diluido.

## ELEMENTOS NO REACTIVOS

### Soporte para micropocillos

#### Solución tampón de lavado:

**Tampón PBS** **PWDR|PBS**: N° de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene polvo tampón suficiente para formar 1 litro. (Se suministran dos bolsas de polvo tampón con cada placa de 96 micropocillos, en kits de análisis completos).

**Concentrado de tampón de lavado** **SOLN|WASH**: Número de catálogo 1031 (10 ml). Solución de Tween 20 al 5%, para utilizar en el tampón de lavado. (Se suministran dos viales de concentrado de tampón con cada lámina de 96 micropocillos, en kits de análisis completos).

**Preparación:** Disuelva el contenido de una bolsa de polvo tampón en un litro de agua desionizada o destilada. Añada todo el contenido de un frasco de concentrado de tampón de lavado al PBS disuelto. Mezcle bien y conserve a 2-25°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otras alteraciones visibles. La solución tampón de lavado debe estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su empleo.

## OTROS MATERIALES NECESARIOS - PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

Pipetas volumétricas de precisión para dispensar volúmenes de 25-1000 µl  
Frasco flexible para añadir solución de tampón de lavado a los micropocillos, o un sistema de lavado automático o semiautomático para micropocillos  
Envase de un litro para la solución tampón de lavado PBS  
Agua desionizada o destilada  
Espectrofotómetro de lectura de placas capaz de interpretar absorbancia a 450 nm  
Probetas para preparar las diluciones de suero  
Papel secante o toallas de papel  
Pipeta multicanal capaz de dispensar a 8 pocillos  
Guantes desechables  
Cronómetro

## PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto han sido analizados en busca de anticuerpos con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de la hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAG) con métodos homologados por la FDA, obteniendo resultados negativos (no reactivos en varias ocasiones) en todos los casos. Pero no existe ningún método de análisis que pueda garantizar por completo la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por eso, todos los materiales del kit deben ser manipulados como si fueran infecciosos.
2. Todos los sueros de control, los sueros de calibración y las muestras de pacientes deben ser manipuladas según el nivel 2 de bioseguridad, según recomienda en el manual de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. En los sueros de control y calibración se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con las conducciones de plomo o cobre y formar sales de azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar los reactivos, lavar con grandes volúmenes de agua del grifo para evitar que queden residuos en las tuberías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
4. La disolución de los componentes o su sustitución por otros distintos de los suministrados con el sistema puede arrojar resultados incoherentes.
5. No inactive por calor las muestras de suero utilizadas para la detección selectiva de ENA RELISA®. La inactivación por calor puede hacer que aumenten los valores.
6. Este kit es para uso diagnóstico *in vitro*.
7. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lávese con un jabón germicida y agua abundante.
8. Esta prohibido fumar, comer o beber en las zonas de manipulación de las muestras o los reactivos del kit.
9. Evite salpicaduras y la generación de aerosoles en todo momento.
10. Si los tiempos de incubación y las temperaturas no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
11. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos. Las muestras deben permanecer en los micropocillos durante el análisis.
12. Los elementos de vidrio reutilizables deben ser lavados y enjuagados a fondo para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos los elementos de vidrio deben estar limpios y secos antes de su uso.
13. Todos los reactivos, micropocillos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
14. Para manipular las muestras y los reactivos debe utilizar guantes desechables, y cuando acabe deberá lavarse bien las manos.
15. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
16. El reactivo de parada es corrosivo y puede producir quemaduras. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

**Obtención:** La muestra ideal es suero. Se obtendrán aproximadamente 5 ml de sangre por venipunción aséptica, con un tubo de vacío estéril u otro sistema de obtención adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25°C). Se separará el suero del coágulo por centrifugado cuanto antes, para que la hemólisis sea mínima.

**PRECAUCIÓN:** *No inactive por calor las muestras de suero utilizadas para la detección selectiva de ENA RELISA®. La inactivación por calor puede hacer que aumenten los valores.*

**Sustancias que interfieren:** No se utilizarán sueros que muestren grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, pues en todas esas circunstancias se pueden producir resultados aberrantes. Si la muestra presenta partículas visibles, éstas deben ser eliminadas por centrifugado antes de la prueba.

**Conservación:** Los sueros se pueden conservar a 2-10°C durante una semana como máximo. Si el análisis se posterga, los sueros deben conservarse congelados a una temperatura de -20°C o inferior. No se utilizarán refrigeradores ni congeladores con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

**PRECAUCIÓN:** Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

# OBSERVACIONES GENERALES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Es muy importante que todos los componentes del kit y las muestras de suero estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de utilizarlos. Para que un litro entero de tampón de lavado sacado del refrigerador alcance los 20°C, puede ser necesario calentar durante varias horas. Si las temperaturas de incubación son superiores o inferiores a las recomendadas puede que los resultados no sean precisos. Las muestras y reactivos no utilizados deben ser devueltos al refrigerador.
2. Mezcle bien los reactivos antes de utilizarlos, dando la vuelta al envase con suavidad. No agite ni remueva los reactivos. Evite que se forme espuma.
3. Para preparar las diluciones de muestras, limpie la punta de las pipetas antes de utilizarlas para poner suero en el disolvente. Si queda muestra adherida al exterior de la punta de la pipeta, los resultados pueden variar.
4. Se recomienda utilizar una pipeta multicanal porque con ella la dispensación del reactivo y los tiempos de incubación y reacción son más uniformes.
5. **Es extremadamente importante lavar bien los pocillos.** Si no es así, los valores de fondo serán muy elevados, lo que se puede traducir en resultados falsos positivos. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado. Se recomienda utilizar un sistema de lavado automático de los micropocillos, ya que así su limpieza queda garantizada.  
**NOTA:** Como existen diversas técnicas de lavado y de sistemas automáticos, hay que ajustar el número de lavados para que los resultados sea óptimos. Cada laboratorio determinará el número de lavados más eficaz para su sistema de lavado.
6. Si no se elimina todo el tampón puede que la aparición de color no sea homogénea. Para ello, hay que limpiar con fuerza las tiras de micropocillos, secándolas con papel secante o toallas absorbentes.
7. El tiempo de cada paso es fundamental. Antes de iniciar el procedimiento se disolverán las muestras de suero, que deben ser dispuestas en los micropocillos en el menor tiempo posible (no más de cinco minutos). Los tamaños de lote deben determinarse de forma que se puedan manipular las muestras en este período de tiempo con comodidad. Se recomienda utilizar pipetas multicanal, pues facilitan la manipulación de las muestras y los reactivos.
8. A excepción de la última incubación (solución de sustrato), cada período de incubación empieza al finalizar la dispensación de la muestra o el reactivo. La incubación de la solución de sustrato debe durar exactamente 30 minutos para cada pocillo. Todas las muestras y reactivos deben dispensarse con la misma secuencia y a velocidad constante.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### CÁLCULOS

1. Reste el valor de la absorbancia del pocillo sin reactivo, de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de calibración, control y muestra del paciente. Calcule los valores medios de la absorbancia en pocillos duplicados.
2. Para obtener el factor de conversión, se divide la concentración de anticuerpos específicos del suero de calibración (que figura en la etiqueta) por el valor medio de la absorbancia medida en los pocillos de calibración.
3. Para obtener la concentración de anticuerpo específico en unidades, se multiplican los valores de la absorbancia de cada muestra por el factor de conversión.
4. Este cálculo se puede expresar de forma simplificada como:

$$\frac{U_c \times \lambda_s}{\lambda_c} = U_s$$

$U_c$  = Valor del calibrador (unidades)

$\lambda_c$  = Absorbancia del calibrador\*

$\lambda_s$  = Absorbancia de la muestra\*

$U_s$  = Valor de la muestra en unidades

\*Si se analizan los calibradores y las muestras por duplicado, utilice la absorbancia promedio de los pocillos duplicados.

## CONTROL DE CALIDAD

1. El valor medio de la absorbancia de los pocillos de calibración debe ser de 0,400 como mínimo. Si es inferior, la aparición del color no es adecuada y el ciclo no es válido. Si la aparición del color no es adecuada suele deberse a que los reactivos están fríos o a que la duración de uno o más pasos de la prueba no ha sido correcta. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) y repita el ciclo prestando especial atención a la duración de todos los pasos.
2. El pocillo de control vacío debe presentar un valor de absorbancia inferior a 0,150. Si los valores de absorbancia en el pocillo vacío son superiores a 0,150, ello indica que el lavado no ha sido adecuado o que se han contaminado los reactivos.
3. Las muestras que presentan valores específicos de anticuerpos por encima del límite superior del calibrador deberán ser reportadas como positivas con un valor "mayor a o igual al" valor estipulado en la etiqueta del calibrador.
4. Es necesario calcular el factor de conversión en cada ciclo. Si se emplea el factor de conversión de otro ciclo, los resultados no serán válidos.
5. Cada laboratorio deberá establecer y mantener sus propios rangos de referencia (normal), en función de la población de pacientes y de otros factores locales.
6. El suero de control positivo es un suero humano que contiene anticuerpos contra uno o más de los antígenos nucleares extraíbles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y/o Jo-1. Se trata de un control cualitativo que debe dar un valor superior a 20 unidades ENA.
7. El suero de control negativo es una mezcla de sueros humanos que no contiene anticuerpos contra ninguno de los seis autoantígenos de este análisis. Se trata de un control cualitativo que debe dar un valor inferior a 20 unidades ENA.
8. El suero de control positivo no diluido es un suero humano que contiene anticuerpos contra uno o más de los antígenos nucleares extraíbles Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 y/o Jo-1. Este control debe dar un valor de más de 20 unidades ENA.
9. Si alguno de los valores de control se sale del rango, la prueba no es válida y debe repetirse.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PACIENTE

1. Se trata de un análisis cualitativo. Los niveles de anticuerpos detectados carecen de significado clínico, y las cifras obtenidas en unidades sólo sirven para separar a los pacientes en los siguientes tres grandes grupos. Se consideran positivos los pocillos con muestra de paciente cuyos valores calculados sean  $\geq 25$  unidades ENA; serán sometidos a un análisis de especificidades ENA individuales. Los pocillos con muestras de pacientes que presentan valores calculados inferiores a 20 unidades ENA se consideran negativos. Los valores entre 20 y 25 unidades ENA se consideran positivos en el límite y deben repetirse o ser sometidos a la detección individual de ENA. Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites de referencia y valores de corte, en función de la población de pacientes evaluada. Los valores resultan afectados por factores de los pacientes, consideraciones mecánicas (como la exactitud y precisión del pipeteado) y las condiciones del análisis (como la temperatura y la cronología de los pasos).
2. Como quiera que el análisis de detección selectiva en pocillo único de ENA RELISA<sup>®</sup> contiene una mezcla de antígenos, los resultados representan una combinación de las reacciones de los anticuerpos contra los seis antígenos. Si los niveles de los diversos anticuerpos son bajos, el análisis de detección selectiva en pocillo único de ENA RELISA<sup>®</sup> puede dar resultado positivo, pero puede que la presencia de los antígenos individuales sea inferior al punto de corte de cada uno de ellos.

## NOTIFICACIÓN DE RESULTADOS

Se indicará si el resultado es positivo o negativo para los anticuerpos correspondientes a los antígenos nucleares extraíbles. Los niveles de anticuerpos carecen de significado clínico conocido.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No es posible hacer un diagnóstico basándose sólo en la detección de anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar un tratamiento basándose exclusivamente en un resultado positivo del análisis de anticuerpos con antígenos nucleares extraíbles. Antes de iniciar un tratamiento hay que tener en cuenta las indicaciones clínicas, otros hallazgos de laboratorio y la impresión clínica del médico.
3. Algunos pacientes con enfermedades autoinmunitarias pueden presentar niveles indetectables o insignificantes de anticuerpos contra los antígenos nucleares extraíbles, y algunos individuos pueden presentar niveles elevados con escasos o nulos datos de enfermedad. El médico debe interpretar estos resultados en el contexto de la historia y los síntomas del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.

4. El nivel de anticuerpos detectado con este sistema de análisis no indica necesariamente la intensidad o la duración de la enfermedad.

## VALORES ESPERADOS

La incidencia de autoanticuerpos contra los diversos antígenos nucleares varían en función de la población de pacientes y de la incidencia de enfermedades reumáticas clínicas en esa población. En tabla 1 se resume la asociación de los anticuerpos a las enfermedades reumáticas concretas.

**Tabla 1**

Anticuerpos anti:	Asociación a enfermedades:
Sm	Anticuerpo marcador muy específico que se observa en el 25-30% de los pacientes con SLE
U1-RNP	Enfermedades mixtas del tejido conjuntivo >95%; LES 35%; menor frecuencia en el lupus discoide o la esclerosis sistémica progresiva (ESP)
SSA/Ro	Síndrome de Sjögren 60-70%; LES 50%
SSB/La	Síndrome de Sjögren 40-50%; LES 15%
Scl-70	Anticuerpo marcador muy específico que se observa en el 15-20% de los pacientes con ESP
Jo-1	Anticuerpo marcador muy específico que se observa en el 25-30% de los pacientes con polimiositis o dermatomiositis

### LÍMITES DE REFERENCIA

Los límites de referencia se han establecido a partir de sueros de 403 donantes de sangre sanos, 205 mujeres y 198 varones, ninguno de los cuales presentaba antecedentes de enfermedades reumáticas. Basándose en estos datos, se establecieron los valores de corte normales en <20 unidades ENA. La buena práctica exige que cada laboratorio establezca sus propios límites de normalidad en función de su población de pacientes y de otros factores locales.

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se comparó el sistema de detección selectiva de ENA en pocillo único RELISA® de Immuno Concepts con el sistema de detección selectiva de ENA con múltiples parámetros RELISA® de Immuno Concepts. La población estudiada consistió en 50 pacientes que cumplían los criterios para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, 25 pacientes con miositis inmunitaria o síndrome de superposición de miositis, 23 pacientes con diagnóstico de esclerodermia o esclerosis sistémica progresiva, 21 pacientes con síndrome de Sjögren, 3 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide, 18 pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo indiferenciadas y 403 individuos sin enfermedades autoinmunitarias conocidas. Según estas comparación, se obtuvieron los siguientes datos. Tabla 2.

	Positivo	Borderline	Negativo
Immuno Concepts Pocillo Único Detección Selectiva de ENA	126	9	5
	0	2	4
	1	2	394

Los resultados en el límite se consideraron positivos. Estos datos arrojan la siguiente estadística: sensibilidad relativa, 97,9%; especificidad relativa, 97,8%; y concordancia general, 97,8%.

### REPRODUCIBILIDAD

Se analizaron seis muestras positivas y cinco negativas en tres números de lote diferentes de tiras de antígenos, en tres ocasiones diferentes. En ningún caso hubo una muestra negativa que diera positivo, y las positivas lo siguieron siendo claramente.

# BIBLIOGRAFICI

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
2. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *52:148-159, 1972.*
5. Sharp, G.C., Irwin, May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm Antigens with mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Other Rheumatic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
6. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
7. Alspaugh, M.A., Talal, N., and Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
8. Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
9. Nishikai, M. and Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear Non-histone Basic Protein (Mi-1) which reacts with Anti-immunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17: 1129-1141, 1980.
10. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
11. Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzler, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
12. Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
13. Fritzler, M.J. and Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases, p. 207-247. In Cohen, A.S. (ed.), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases (Third Edition)*. Grune and Stratton, Orlando, FL, 1985.
14. Tan, E.M. and Kunkel, H.G. Characteristics of a Soluble Nuclear Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
15. Winfield, J.B., Brunner, C.M., and Koffler, D. Serological Studies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Central Nervous System Dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
16. Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
17. Hamburger, M., Hodes, S., and Barland, P. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Am. J. Med. Sci.* 273:21-28, 1977.
18. Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
19. Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewolski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
20. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
21. Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
22. Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
23. Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
24. Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
25. Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
26. Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
27. Wasicek, C.A. and Reichlin, M. Clinical and Serological Differences Between Systemic Lupus Erythematosus Patients with Antibodies to Ro versus Patients with Antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69:835-843, 1982.
28. Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
29. Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease – A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
30. Guldner, H.H., Szosteck, C., Vosberg, H.P., et al. Sci 70 Autoantibodies from Scleroderma Patients Recognize a 95 kDa Protein Identified as DNA Topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138, 1986.
31. Jarzabek-Chorzelska, M., Blaszczyk, M., Jablonska, S., et al. Sci 70 Antibody-A Specific Marker of Systemic Sclerosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:393-401, 1986.
32. Bernstein, R.M., Morgan, S.H., Chapman, J., et al. Anti-Jo-1 Antibody: A marker for Myositis with Interstitial Lung Disease. *Brit. Med. J.* 289:151-152, 1984.

**En caso de daños al envoltorio protector, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de usar el producto.**



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación De la Temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Dispositivo Médico De diagnóstico In vitro



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827  
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649  
 Email: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)



# PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DETECCIÓN SELECTIVA DE ENA EN POCILLO ÚNICO CON RELISA®

Todas las muestras (incluida la solución tampón de lavado) y los micropocillos deben estar a temperatura ambiente antes de su empleo.

## 1. PREPARACIÓN DE LA HOJA DE TRABAJO

Marque la hoja de trabajo que se adjunta con el kit, para indicar la localización de las muestras en los micropocillos. Analice el calibrador por duplicado. Un pocillo debe quedar libre de reactivo. Recomendamos que todas las muestras de pacientes y de control se analicen por duplicado hasta que se alcance una precisión aceptable en su laboratorio.

## 2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN TAMPÓN DE LAVADO (PBS-Tween)

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón PBS en un litro de agua desionizada o destilada. Añada todo el contenido de un frasco de concentrado de tampón de lavado al envase de un litro de PBS disuelto. Mezcle bien. La solución tampón de lavado se puede tapar y conservar a 2-25°C durante cuatro semanas como máximo.

## 3. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Disuelva las muestras de pacientes a 1:40 añadiendo 25 µl de suero a 975 µl de disolvente de muestras. Si utiliza el control positivo analizado no diluido de ENA opcional, deberá disolverlo igual que las muestras de los pacientes. Mezcle bien. Los controles positivos y negativos y el calibrador se entregan a la dilución de trabajo, por lo que no es necesario disolverlos.

## 4. PREPARACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS

Saque de la bolsa el número requerido de tiras de micropocillos y coloquelos en el soporte provisto. Los micropocillos deben quedar firmemente sujetos en el soporte. Precione firmemente ambos lados de cada tira de forma que encajen bien dentro del soporte. Si emplean pocillos individuales o menos de una tira completa de pocillos asegúrese de que queden bien encajados. Los pocillos que están bien encajados no se caerán si voltea el soporte al revés. Si se necesitan menos de ocho pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito desecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.

## 5. DISPENSACION DE LAS DILUCIONES DE SUERO

Ponga 100 µl de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes diluidas en los pocillos correspondientes, como se describe en la hoja de trabajo. Ponga 100 µl de disolvente de muestras en el pocillo que no lleva reactivo.

## 6. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18-25°C)

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea se pueden tapar las tiras con cinta transparente o con toallas de papel, para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.

## 7. LAVADO DE LAS TIRAS (Véanse las notas 5 y 6 del procedimiento general)

Lave los pocillos 3 a 5 veces en la solución de tampón de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará

con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.

## 8. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO CON ANTICUERPOS ENZIMÁTICOS

Ponga 100 µl de reactivo con anticuerpos enzimáticos en cada pocillo.

## 9. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18-25°C)

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos. Si se desea se pueden tapar las tiras con cinta transparente o con toallas de papel, para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.

## 10. LAVADO DE LAS TIRAS

Lave los pocillos de 3 a 5 veces con solución tampón de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y a continuación lave cada uno con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de los pocillos, sobre todo en el lavado siguiente a la aspiración. Elimine todo el tampón de los pocillos dándoles la vuelta; los residuos de tampón de lavado se quitan con un movimiento brusco de la muñeca. Repita estos pasos hasta un total de 3 a 5 lavados. A continuación, se pasará con fuerza una toalla de papel u otro material absorbente por los pocillos para retirar todo vestigio de tampón de lavado.

## 11. DISPENSACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUSTRATO

Utilizando un cronómetro para que los intervalos sean homogéneos, dispense 100 µl de solución de sustrato en cada pocillo. La solución de sustrato se incorporará a los pocillos a velocidad constante, de forma que todos se sometan al mismo tiempo de incubación (30 minutos). La solución de sustrato incubada en los pocillos con muestras positivas se volverá de color azul, y si son muestras negativas, serán incoloras o de azul muy claro.

## 12. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (exactamente 30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18-25°C)

Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos exactamente. Durante la incubación, la temperatura no podrá sufrir cambios bruscos.

## 13. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO DE PARADA

Cuando el primer pocillo haya sido incubado durante 30 minutos exactos, añada 100 µl de reactivo de parada a cada pocillo, en el mismo orden y a la misma velocidad en que se añadió la solución de sustrato a los pocillos. Tras añadir el reactivo de parada, la solución de sustrato azul se volverá amarilla y la incolora permanecerá tal cual.

## 14. INTERPRETACIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LOS POCILLOS

En los treinta minutos siguientes a la adición del reactivo de parada, los pocillos deben ser medidos en un espectrofotómetro de lectura de placas. Los pocillos se medirán a 450 nm, frente al pocillo sin reactivo. Si se dispone de un espectrofotómetro con doble longitud de onda, la del filtro de referencia debe ser de 600-650 nm. Si se leen los micropocillos a 450 nm sin filtro de referencia, los valores de la absorbancia serán más elevados.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

