

SISTEMA DE ANÁLISIS RELISA® de anti-dsADN

Para el uso en diagnósticos in vitro

Únicamente para uso profesional

Números de catálogo: 7096-17 (96 pocillos) y 7696-17 (576 pocillos)

USO PREVISTO: *Se trata de un sistema de análisis de inmunoensayo enzimático para la determinación de la presencia de anticuerpos de dsADN en el suero humano. Este sistema de análisis se utilizará como una ayuda en el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico.*

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ANÁLISIS

Los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) pueden producir anticuerpos contra varios antígenos nucleares, pero los que están dirigidos contra el Sm (antígeno Smith) y contra el ADN bicatenario (dsADN) muestran la correlación más elevada con la enfermedad (1). Los anticuerpos dirigidos contra el Sm muestran un patrón de tinción ANA moteado mientras que los anticuerpos dirigidos contra el dsADN generalmente producen un patrón de tinción ANA homogéneo. Aunque niveles bajos de anticuerpos de anti-dsADN se pueden encontrar en el suero de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedad mixta de tejido conjuntivo (2), niveles elevados de estos anticuerpos se pueden encontrar únicamente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE). Se piensa que los anticuerpos dirigidos contra el dsADN participan en la patogénesis de las variantes más severas de SLE cuando se depositan en forma de complejos inmunes (3). Estos anticuerpos se producen a títulos altos y al estar correlacionados con la actividad de la enfermedad (4), su detección es importante en el tratamiento de pacientes con SLE.

Existen numerosos ensayos para la detección de anticuerpos anti-dsADN. Entre los métodos que se utilizan más a menudo se incluye la inmunofluorescencia indirecta, el radioinmunoensayo, la contrainmunolectroforesis y la innumodifusión (5-8) El sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts es un método de inmunoensayo enzimático (EIA) que detecta anticuerpos al dsADN en el suero.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

Este análisis es un inmunoensayo enzimático (EIA) indirecto. La superficie de los micropocillos se ha recubierto de antígenos estabilizados de dsADN que se utilizarán a modo de sustrato antigénico en este sistema. Disoluciones de las muestras del paciente se sitúan en los micropocillos y se incuban para permitir que anticuerpos específicos de la muestra reaccionen con los antígenos de la fase sólida. Después de lavar los pocillos para eliminar anticuerpos que no hayan reaccionado y otras proteínas del suero, se incuban con anticuerpos anti-humanos de cabra que se etiquetan con peroxidasa de rábano. La preparación de anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano que se incluye en el sistema de análisis es específica para las cadenas gama de la IgG humana.

Tras la incubación con el conjugado de peroxidasa de rábano, si los resultados son positivos se forma un complejo estable de tres partes. Este complejo está compuesto por anticuerpos anti-humanos conjugados con peroxidasa de rábano unidos a anticuerpos humanos al dsADN, que están unidos a los antígenos estabilizados en la superficie plástica.

Después de un lavado posterior, el complejo se detecta mediante la adición de una solución de tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂ como sustrato cromogénico. El grado de coloración desarrollado en cada pocillo es proporcional a la concentración de anticuerpos al dsADN en cada muestra de suero. Se efectúa una lectura de cada pocillo en un espectrofotómetro a 450 nm.

COMPONENTES DEL SISTEMA – MATERIALES PROPORCIONADOS

Almacenamiento: Todos los componentes se deben almacenar en un ambiente refrigerado entre 2 y 10°C. No congelar.

Estabilidad: Todos los componentes permanecerán estables durante al menos 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilizar ningún componente pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS

Tiras de micropocillos recubiertos con dsADN [PLATE]: N° de catálogo 7008-17. Un bastidor de micropocillos que contiene doce tiras de ocho micropocillos cada una, recubiertas con dsADN. Si para el análisis se requieren menos de ocho pocillos, se pueden separar con tan sólo partir las tiras. Las tiras que no se utilicen se pueden guardar en la bolsa de papel de aluminio con el paquete de desecante, selladas con el sello de cremallera y refrigeradas hasta 45 días.

Disolvente para muestras [SOLN|DIL]: Número de catálogo 7100 (100 ml). El disolvente tamponado de muestra patentado se utiliza para diluir las muestras de los pacientes.

Reactivo enzimático para anticuerpos, específico para la cadena gama de la IgG humana [CONJ|HRP]: Número de catálogo 7009-17 (14 ml). IgG antihumana (específica para la cadena gama) conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). El reactivo está listo para su uso.

Solución de sustrato [SOLN|SUB]   : Número de catálogo 7035 (14 ml). Una solución sustrato con enzimas específicos a la HRP que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El reactivo está listo para su uso. **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 el sistema de análisis EIA de Immuno Concepts. El reactivo está listo para su uso. **PELIGRO:** Material corrosivo. Este reactivo contiene ácidos hidrocórico y sulfúrico (menos del 3% de cada uno en volumen) y se debe manipular con cuidado. Mantener fuera del alcance de los niños. En caso de entrar en contacto con los ojos, lavar inmediatamente y a fondo con agua y consultar a un médico. No añadir nunca agua a este reactivo.

Control positivo anti-dsADN [CONTROL|+]: Número de catálogo 7021-17 (2 ml). Suero humano positivo de control que contiene anticuerpos al dsADN. Este suero se encuentra a la disolución apropiada para su uso y está listo para su utilización. Consulte la etiqueta del frasco para ver el rango esperado en Unidades Internacionales/ml (UI/ml).

Control negativo [CONTROL|-]: Número de catálogo 7031 (2 ml). Suero humano negativo de control que no contiene anticuerpos al dsADN. Este suero se encuentra a la disolución apropiada para su uso y está listo para su utilización.

Suero de los calibradores 1 a 4 de anti-dsADN [CAL]: Números de catálogo 7261-17, 7262-17, 7263-17 y 7264-17 (1,5 ml cada uno). Suero calibrador humano que contiene anticuerpos al dsADN. Estos sueros se encuentran a la disolución apropiada para su uso y están listos para su utilización. El calibrador 3 se puede utilizar a modo de calibrador por puntos individuales. Estos sueros calibradores han sido probados en la referencia de la OMS de preparación Wo80 para determinar la concentración de anticuerpos en Unidades Internacionales / ml (UI / ml). Consulte las etiquetas del vial de ADN de doble cadena concentraciones de anticuerpos anti-en UI / ml.

COMPONENTES NO REACTIVOS

SopORTE de micropocillos

Solución tamponada 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 el suficiente polvo tampón para preparar un litro de solución. (Se proporcionan dos bolsas de polvo tampón para cada placa de 96 pocillos en equipos completos de análisis)

Concentrado tamponado de lavado SOLN|WASH: N° de catálogo 1031 (10 ml). Se debe utilizar una solución de Tween 20 al 5% en el tampón de lavado. (Se proporcionan dos viales de concentrado tamponado para cada placa de 96 pocillos en equipos completos de análisis)

Preparación: Disolver una bolsa de polvo tampón en un litro de agua destilada o desionizada. Añadir todo el contenido de una botella de concentrado tamponado de lavado al PBS disuelto. Mezclar bien y conserve a 2-25°C durante un periodo de hasta 4 semanas o hasta que se produzcan signos de contaminación u otros cambios visibles. La solución tamponada de lavado debe estar a temperatura ambiente (18-25° C) antes de su utilización.

Uso: Todos los componentes están listos para ser utilizados sin que sea necesario alicuotarlos o reconstituirlos (excepto en el caso del tampón PBS que se ha de disolver en agua desionizada o destilada antes de su uso)

Estabilidad: Todos los componentes permanecerán estables durante al menos 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilizar ningún componente pasada la fecha de caducidad.

MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS– NO PROPORCIONADOS

Pipeta volumétrica de precisión para manejar volúmenes entre 25 y 1000 µl.

Botella exprimible para repartir la solución tamponada de lavado a los micropocillos o un sistema de lavado automático o semiautomático de los mismos.

Un contenedor de un litro para la solución tamponada de lavado PBS

Agua destilada o desionizada

Un espectrofotómetro de lectura de placas que sea capaz de realizar lecturas de absorbancia a 450 nm

Tubos de ensayo para preparar las disoluciones de suero

Papel secante o toallas de papel

Pipeta multicanal con capacidad para servir a 8 pocillos

Guantes desechables

Cronómetro de laboratorio

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de procedencia humana utilizados en este producto se han analizado y han dado negativo (no reactivos repetidamente) en las pruebas de anticuerpos del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), del virus de inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), del virus de hepatitis C (VCH) y de los antígenos de superficie de hepatitis B (HBsAg) mediante métodos aprobados por la Agencia del Medicamento Estadounidense (FDA). Sin embargo, ningún método de análisis puede garantizar completamente la ausencia de VIH-1, VIH-2, hepatitis C, hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por tanto, todos los materiales del equipo se deben manipular de la misma manera que si pudieran ser infecciosos.
2. Todas las muestras de los pacientes deben manipularse con el nivel 2 de bioseguridad tal y como se recomienda para cualquier espécimen de suero o sangre humano que pueda ser potencialmente infeccioso en los manuales de los centros para el control de enfermedades o los institutos nacionales de salud: *Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos, edición de 1999*.
3. La disolución de los componentes o la sustitución por otros diferentes de los que se proporcionan en este sistema puede producir resultados incoherentes.
4. Se utiliza la azida sódica (0,09%) como conservante. Ésta puede reaccionar con los tubos de plomo o cobre y formar sales metálicas de azidas que son explosivas. Al desechar los reactivos, hacerlo con grandes cantidades de agua para evitar que se puedan formar residuos en las cañerías. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica si se ingiere.
5. Este equipo es para el uso en diagnósticos in vitro.
6. No utilizar nunca la pipeta con la boca y evitar el contacto de los reactivos y los especímenes con la piel y las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar con un jabón germicida y grandes cantidades de agua.
7. No fumar, ingerir alimentos ni bebidas en las zonas donde se manipulan especímenes o reactivos del equipo.
8. Evitar las salpicaduras o la producción de aerosoles en todo momento.
9. Periodos y temperaturas de incubación diferentes a los especificados pueden producir resultados erróneos.
10. La contaminación cruzada de reactivos o muestras puede producir resultados falsos. Las muestras deben permanecer confinadas a los micropocillos durante los análisis.
11. Los objetos de vidrio reutilizables se deben lavar y aclarar completamente de cualquier detergente antes de su uso. Todos los objetos de vidrio se deben lavar y secar antes de su uso.
12. Todos los reactivos, micropocillos y especímenes deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

13. Utilizar guantes desechable para manipular especímenes y reactivos y lavarse las manos a fondo después.
14. La contaminación microbiológica de reactivos o muestras puede producir resultados falsos.
15. El reactivo de control es corrosivo y puede causar quemaduras. Este reactivo contiene ácidos hidroclicórico y sulfúrico (menos del 3% de cada uno en volumen) y se debe manipular con cuidado. Mantener fuera del alcance de los niños. En caso de entrar en contacto con los ojos, lavar inmediatamente y a fondo con agua y consultar a un médico. No añadir nunca agua a este reactivo.

TOMA DE MUESTRAS

Toma de muestras: 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. Dejar que la sangre coagule a temperatura ambiente (18-25° C). El suero se debe separar del coágulo por centrifugación tan pronto como sea posible a fin de minimizar la hemólisis.

Sustancias interferentes: No se deben utilizar sueros que presenten un grado elevado de hemólisis, ictericia, lipemia o brotes microbiológicos porque estas condiciones pueden dar lugar a resultados falsos. Los especímenes que contengan partículas materiales visibles se deben clarificar por centrifugación antes del análisis.

Almacenamiento: Los sueros se pueden almacenar a una temperatura entre 2 y 10° C durante un periodo de hasta una semana. Si el análisis se va a retrasar más, los sueros deben congelarse a temperaturas de -20° C o inferiores. El suero no se debe almacenar en un frigorífico o congelador con sistema "auto-frost" (eliminación automática de la escarcha).

PRECAUCIÓN: El congelar y descongelar las muestras de los pacientes repetidamente puede dar lugar a falsos positivos o negativos en los resultados.

NOTAS GENERALES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Es extremadamente importante que todos los componentes del equipo y las muestras de suero estén a temperatura ambiente (18-25° C) antes de su uso. Un litro de solución de lavado tamponada puede necesitar varias horas para alcanzar una temperatura de 20° C tras sacarla del refrigerador. La incubación a temperaturas por encima o por debajo del margen indicado puede causar resultados incorrectos. Devolver las muestras y los reactivos que no se han utilizado al almacenamiento refrigerado tras su uso.
2. Mezclar los reactivos bien antes de utilizarlos mediante la inversión ligera. No agitar los reactivos para mezclarlos. Evitar la formación de espuma.
3. Al preparar las disoluciones de la mezcla, las puntas de las pipetas se deben limpiar antes de introducir el suero en el disolvente de muestras. El exceso de muestra que se adhiere al exterior de la pipeta afectará los resultados.
4. Se recomienda el use de la pipeta multicanal porque hace que la introducción del reactivo, el tiempo de incubación y el tiempo de reacción sean más uniformes.
5. **Es extremadamente importante limpiar los pocillos de manera adecuada.** El lavado inadecuado de los pocillos generará valores de fondo elevados y puede mostrar valores de falsos positivos. Para el lavado manual, aspirar los contenidos de los pocillos y a continuación rellenar cada uno de ellos con la solución tamponada de lavado. Evitar la contaminación cruzada de los pocillos, especialmente durante el primer lavado después de la aspiración. Drenar todo el tampón de lavado de los pocillos invirtiéndolos y después sacudiendo la solución residual fuera de los mismos con un movimiento brusco y seco de la muñeca. Repetir los pasos de llenado y drenaje hasta completar un total de 3 a 5 lavados. A continuación los pocillos se deben golpear vigorosamente sobre una toalla de papel u otro material absorbente para eliminar todas las trazas de tampón de lavado residual. El uso de un sistema de lavado de los micropocillos automático asegurará que el proceso sea sistemático, tal y como se recomienda.
NOTA: Debido a los diferentes tipos de técnicas de lavado y sistemas automatizados, el número de lavados se puede ajustar para obtener unos resultados óptimos. Cada laboratorio debe determinar el número de lavados más eficiente para su sistema de lavado.
6. La eliminación inadecuada del tampón de lavado residual puede provocar una coloración incoherente. Las tiras de micropocillos se deben secar con papel secante o con toallas de papel para reducir al mínimo el tampón de lavado residual.
7. La temporización de todos los pasos es crítica. Todas las muestras de suero se deben diluir antes de comenzar el procedimiento y se deben introducir en los micropocillos tan rápidamente como sea posible (en menos de cinco minutos). El tamaño de los lotes se debe configurar de manera que la manipulación de los especímenes se pueda completar cómodamente dentro de este periodo de tiempo. El uso de una pipeta multicanal facilita la manipulación de las muestras y reactivos y por ello se recomienda.

8. Con la excepción de la última incubación (solución de sustrato), el principio de cada periodo de incubación comienza cuando se completa la introducción de la mezcla o del reactivo. La incubación de la solución de sustrato debe ser exactamente 30 minutos para cada pocillo. Todas las muestras y reactivos se deben introducir en el mismo orden y a un ritmo constante.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CÁLCULOS

1. Sustraer el valor de la absorbancia del pocillo en blanco de reactivo de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos estándar, de control y de las muestras del paciente. Calcular el valor medio de absorbancia para pocillos duplicados.
2. Situar el valor de la absorbancia de cada suero calibrador, del 1 al 4, en hoja de cálculo de la curva de calibración de RELISA®. Para ello utilizar el valor de D.O. ajustado en blanco para los ejes de las x y el valor UI/ml de la etiqueta para el eje de las y. Trazar la línea que mejor una los puntos del calibrador.
3. Obtener el valor de UI/ml de cada muestra de paciente interpolándolo desde la curva del calibrador.
4. Si se utiliza el programa informático, utilizar un ajuste de cuatro parámetros con coordenadas lin-log para la densidad óptica y la concentración, y la curva que mejor una los puntos.

MÉTODO DE CALIBRACIÓN OPCIONAL POR PUNTOS INDIVIDUALES

1. Sustraer el valor de la absorbancia del pocillo en blanco de reactivo de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos calibradores, de control y de las muestras del paciente. Calcular el valor medio de absorbancia para pocillos duplicados.
2. Dividir la concentración de anticuerpos específicos en UI/ml en el calibrador nº 3 (indicada en la etiqueta) por el valor medio de absorbancia de los pocillos del calibrador para obtener el factor de conversión.
3. Multiplicar los valores de absorbancia de cada muestra por el factor de conversión para obtener la concentración de los anticuerpos específicos en UI/ml.
4. Estos cálculos se pueden expresar de la siguiente manera simplificada:

$$\frac{\text{Valor del calibrador nº 3 (UI/ml)}}{\text{Absorbancia del calibrador nº 3}} \times \text{Absorbancia de la muestra}^* = \text{UI/ml Valor de la muestra}$$

*Si los calibradores y las muestras se realizan por duplicado, utilizar la absorbancia media de los pocillos duplicados.

CONTROL DE CALIDAD

1. El valor de la absorbancia media del calibrador nº 3 debe ser al menos 0,400. Valores de absorbancia menores de 0,400 indican que el color se ha desarrollado de manera inadecuada o que se ha realizado un intento inválido. El desarrollo inadecuado del color normalmente se debe al uso de reactivos fríos o a la temporización incorrecta de alguno de los pasos del ensayo. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25° C) y repetir el intento prestando especial atención a la temporización de los pasos.
2. El pocillo de control en blanco debe mostrar un valor de absorbancia de menos de 0,150. Valores de absorbancia en blanco de más de 0,150 indican que el lavado ha sido inadecuado o que los reactivos se han contaminado y por tanto el intento es inválido.
3. Los valores del anticuerpo anti-dsADN obtenidos para los sueros de control positivo deben estar dentro de los límites que se indican en las etiquetas. Esta escala se ha establecido para incluir al 95% de los valores esperados debido a la variación estadística habitual. En ocasiones se pueden esperar desviaciones pequeñas fuera de estos límites. Cada laboratorio debería establecer sus propios criterios de aceptación o rechazo según su propia experiencia con este ensayo.
4. Las muestras con valores de anticuerpos específicos mayores que el límite superior del calibrador nº 3 se deberán registrar como mayores que el valor de unidad del calibrador nº 3.
5. La curva del calibrador se debe trazar para cada intento (o se debe calcular el factor de conversión para cada uno de ellos si se utiliza la calibración por puntos individuales opcional). El uso de factores de conversión o curvas de conversión de otros intentos invalidará los resultados.
6. Cada laboratorio debe establecer y mantener su propia escala de valores de referencia (normales), basada en su población de pacientes y otros factores locales.
7. El suero de control positivo es un suero humano que contiene anticuerpos al dsADN. Éste es un control cualitativo que debería producir un valor mayor de 35 UI/ml.
8. El suero de control negativo es un suero humano que no contiene anticuerpos al dsADN. Este control debería producir valores menores de 35 UI/ml.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS PACIENTES

Se ha observado que los niveles de anticuerpos al dsADN suben y bajan durante el desarrollo de la enfermedad, pero el significado clínico del nivel de un anticuerpo único todavía se está estudiando (13). Los valores de unidades obtenidos en este ensayo se utilizan tan solo para separar a los pacientes en los siguientes grupos generales. Los pocillos de muestras de pacientes con valores calculados mayores o iguales a 35 UI/ml se consideran positivos. Los pocillos de muestras de pacientes con valores calculados de menos de 35 UI/ml se consideran negativos. Cada laboratorio debe establecer sus propias escalas de referencia y valores límite basados en la población de pacientes que se está analizando. Los valores de unidades se pueden ver afectados por factores de los pacientes, consideraciones mecánicas (tales como la precisión y la exactitud del pipeteado) y las condiciones del ensayo (tales como la temperatura y la temporización de los pasos). Las determinaciones en serie de los niveles de anticuerpos en un paciente pueden indicar el aumento o el descenso de estos niveles.

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se presentarán como positivos o negativos a los anticuerpos del dsADN, con el valor de la UI/ml. Los niveles de anticuerpos encontrados en una sola muestra poseen una significancia clínica limitada. Determinaciones en serie de los niveles de anticuerpo en un paciente pueden indicar el aumento o el descenso de los niveles de anticuerpos, que, como se ha observado, siguen el curso de la enfermedad (13).

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

1. El diagnóstico no se puede realizar únicamente en base a la identificación de anticuerpos anti-dsADN. El médico debe interpretar estos resultados junto con el historial del paciente, sus síntomas, las evidencias físicas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. El tratamiento no se debe iniciar basándose solamente en un resultado positivo de la prueba de anticuerpos anti-dsADN. Antes de iniciar cualquier tratamiento, se deben tomar en consideración las indicaciones clínicas, los resultados de otros laboratorios y la impresión clínica del médico.
3. Ciertas drogas, entre las que se incluyen la procainamida y la hidralazina, pueden inducir una enfermedad similar al lupus eritematoso. Pacientes con LE inducido pueden dar resultados positivos de ANA que normalmente se dirigen contra histonas nucleares, aunque también se han observado anticuerpos contra dsADN (9-10, 14).
4. Aunque un nivel elevado de anti-dsADN es una fuerte indicación de LES, no se debe considerar como un diagnóstico, sino más bien como una parte del historial clínico global del paciente. Niveles bajos de anticuerpos de dsADN se producen a menudo en el suero de pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide y enfermedad mixta de tejido conjuntivo (2).
5. Pacientes que estén siguiendo una terapia de esteroides pueden producir resultados negativos a anticuerpos de dsADN (11).
6. Los resultados de esta prueba se deben utilizar junto con la información disponible acerca de la evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico para determinar la situación clínica del paciente.

VALORES ESPERADOS

El valor esperado en un grupo de población normal es negativo (menos de 35 UI/ml). En pacientes con lupus sistémico, hasta el 70% pueden mostrar anticuerpos de anti-dsADN (15). Ciertas drogas pueden inducir la producción de anticuerpos de dsADN (14).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se comparó el sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts con otro sistema de análisis EIA de IgG anti-dsADN de distribución comercial. La población estudiada consistió en 108 muestras que fueron positivas para ADN de doble cadena y 100 muestras de donantes de sangre normales que fueron evaluadas en paralelo con el dispositivo predicado y el dispositivo de sujeción. En base a esta comparación, los siguientes datos fueron obtenidos utilizando el método de punto de calibración multi-:

Sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN	Prueba anti-dsADN IgG anterior	
	Positivo	Negativo
Positivo	105	6
Negativo	3	94

Estos datos produjeron las estadísticas siguientes: acuerdo positivo, 97,2%; acuerdo negativo, del 94,0%, y un acuerdo global, el 95,7%.

Basándose en esta comparación, se obtuvieron los siguientes datos con el método de punto individual opcional:

Sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN	Prueba anti-dsADN IgG anterior	
	Positivo	Negativo
Positivo	103	5
Negativo	5	95

Estos datos produjeron las estadísticas siguientes: acuerdo positivo, 95,4%; acuerdo negativo, del 95,0%, y un acuerdo global, el 95,2%.

Rango normal: El rango normal para este ensayo se determinará analizando muestras de suero de 261 donantes de sangre sanos. Sólo dos de estas muestras tuvieron valores superiores a 35 UI / ml de anticuerpos anti-DNA de doble cadena.

ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts se utilizó para analizar muestras de suero de ciento diecisiete pacientes que habían acudido a consultas reumatológicas. Se seleccionó este grupo de pacientes debido a sus enfermedades reumáticas y no por ningún estado específico de su enfermedad. De todos ellos, cuatro muestras (3,4%) resultaron positivas para anticuerpos anti-dsADN.

SENSIBILIDAD CLÍNICA

Se analizaron muestras de treinta y nueve pacientes con LES mediante el sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts. Ocho de esas muestras (20,5%) dieron un resultado positivo para anticuerpos anti-dsADN.

REPRODUCIBILIDAD

La precisión de este ensayo se midió con tres muestras que tenían valores de anti-dsADN en la parte lineal de la curva de calibración. Estas muestras se analizaron 20 veces en tres números de lote diferente de tiras de micropocillos recubiertas de antígeno en una sola prueba realizada por un solo técnico. La precisión intra e inter ensayo se muestra en las siguientes tablas:

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

n=20	Promedio (UI/ml)	D.E.	%C.V.
Muestra 1	610	14	2
Muestra 2	315	14	5
Muestra 3	114	10	9

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

n=60	Promedio (UI/ml)	D.E.	%C.V.
Muestra 1	601	24	4
Muestra 2	329	16	5
Muestra 3	122	11	9

VALIDACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE PUNTOS INDIVIDUALES

El uso de un calibrador de puntos individuales se validó utilizando el mismo panel de 108 sueros que se emplearon para realizar la comparación con el sistema previo. Un análisis de regresión de esta comparación mostró un coeficiente de regresión (r^2) del 97,95%. Desde un punto de vista práctico, en esta comparación se vieron sólo tres muestras (2,7%) que mostraron discrepancias de diagnóstico entre el sistema de calibración de cuatro puntos y el de punto individual opcional. Todas estas muestras tenían valores de UI/ml de anti-dsADN cercanos al límite de 35 UI/ml, variando entre 33 y 40 UI/ml. Este tipo de muestra constituye un problema de diagnóstico en cualquier sistema de ensayo y los profesionales del laboratorio que analizan las muestras e interpretan los datos lo deben tener en consideración cuidadosamente.

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Se analizaron un total de 11 sueros que contenían anticuerpos entre los que se incluían Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70 y Jo-1 con el sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts. Ninguna de estas muestras dio un resultado positivo en el sistema de análisis RELISA® de anti-dsADN de Immuno Concepts.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:131-140, 1976.
4. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. Clin. Exp. Immunol. 22:9-15, 1975.
5. Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. Science 161:806-807, 1968.
6. Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 16:199-207, 1973.
7. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 17:209-218, 1974.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
10. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
11. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.
12. Data on file, Immuno Concepts, N.A., Ltd.
13. Kavanaugh, A.F., Solomon, D.H., et al. Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: Anti-DNA Antibody Tests. Arthritis Care Res. 47:546-555, 2002.
14. Vedove, C.D., Giglio, M.D., Schena, D., et al. Drug-induced Lupus Erythematosus. Arch. Dermatol. Res. 301:99-105, 2009.
15. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J. Clin. Pathol. 53:424-432, 2000.

En caso de daños en el embalaje de protección, contactar Immuno Concepts antes del uso.



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Limitación de temperatura



Contiene suficiente para >n> pruebas



Consultar las instrucciones de uso



Dispositivo para el diagnóstico médico in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Asistencia técnica EEUU: 1.800.251.5115 Desde fuera de los EEUU: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 7096-17-I,

4.11.02.003.124-Es

Rev 2.2

© Copyright 2016

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS RELISA® DE ANTI- DSADN

Todas las muestras, reactivos (incluyendo la solución tamponada de lavado) y micropocillos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso.

- 1. PREPARAR LA HOJA DE TRABAJO**

Etiquetar la hoja de trabajo que se incluye en el equipo para indicar la ubicación de las muestras en los micropocillos. Ensayar los calibradores por duplicado. Para utilizar la curva de puntos múltiples se deben comprobar los cuatro calibradores. Para el método de calibración del punto individual opcional, sólo hace falta comprobar el calibrador de suero n° 3 por duplicado. Un pocillo se utilizará blanco de reactivo. Recomendamos que cada muestra de control y de paciente se analice por duplicado hasta que se haya establecido una precisión aceptable para el ensayo en el laboratorio.
- 2. PREPARAR LA SOLUCIÓN TAMPONADA DE LAVADO (PBS-Tween)**

Disolver el contenido de una bolsa de tampón PBS en un litro de agua destilada o desionizada. Añadir todo el contenido de una botella de concentrado tamponado de lavado al contenedor de un litro de PBS disuelto. Mezclar bien. La solución tamponada de lavado se puede cubrir y almacenar a una temperatura de entre 2 y 25° C durante hasta cuatro semanas.
- 3. DILUIR DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES**

Diluir las muestras de los pacientes a 1:40 añadiendo 25 µl de suero a 975 µl de disolvente de muestras. Mezclar bien. El calibrador y los controles positivo y negativo se suministran a la concentración correcta y no es necesario diluirlos más.
- 4. PREPARAR LOS MICROPOCILLOS**

Extraer el número de tiras de micropocillos necesarias de la bolsa y colocarlas en el marco de soporte. Hay que encajar los micropocillos firmemente en el marco de soporte. Presionar con firmeza ambos extremos de las tiras para que encajen con un clic en el marco de soporte. Si se utilizan pocillos individuales o menos de una tira de pocillos completa, asegurarse de que cada pocillo se ajusta firmemente. Si los pocillos se encajan correctamente en el marco de soporte, no caerán cuando este se invierta. Si para el análisis se requieren menos de ocho pocillos, se pueden separar con tan sólo partir las tiras. Los pocillos que no se utilicen se pueden guardar en la bolsa de papel de aluminio, sellados con el sello de cremallera y refrigerados hasta 45 días.
- 5. REPARTIR LAS DISOLUCIONES DE SUERO**

Introducir 100 µl de calibradores, controles y muestras de pacientes diluidas en los pocillos correspondientes tal y como se indica en la hoja de trabajo. Introducir 100 µl del disolvente de muestras en el pocillo blanco de reactivo.
- 6. INCUBAR LAS TIRAS** (durante 30 minutos a temperatura ambiente, o sea, entre 18 y 25° C)

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las tiras se deben proteger contra corrientes o cambios de temperatura durante el periodo de incubación. Si se desea, las tiras se pueden cubrir con una película transparente o con una toalla de papel para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.
- 7. LAVAR LAS TIRAS** (Véanse las notas 5 y 6 del proceso general)

Lavar los pocillos entre 3 y 5 veces con la solución tamponada de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspirar los contenidos de los pocillos y a continuación rellenar cada uno de ellos con la solución tamponada de lavado. Evitar la contaminación cruzada de los pocillos, especialmente durante el primer lavado después de la aspiración. Drenar todo el tampón de lavado de los pocillos invirtiéndolos y después sacudiendo la solución residual fuera de los mismos con un movimiento brusco y seco de la muñeca. Repetir los pasos de llenado y drenaje hasta completar un total de 3 a 5 lavados. A continuación los pocillos se deben golpear vigorosamente sobre una toalla de papel u otro material absorbente para eliminar todas las trazas de tampón de lavado residual.
- 8. INTRODUCIR EL REACTIVO DE ANTICUERPOS Y ENZIMAS**

Introducir 100 µl de reactivo de anticuerpos y enzimas en cada uno de los pocillos.
- 9. INCUBAR LAS TIRAS** (durante 30 minutos a temperatura ambiente, o sea, entre 18 y 25° C)

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las tiras se deben proteger contra corrientes o cambios de temperatura durante el periodo de incubación. Si se desea, las tiras se pueden cubrir con una película transparente o con una toalla de papel para protegerlas del polvo u otros cuerpos extraños.
- 10. LAVAR LAS TIRAS**

Lavar los pocillos entre 3 y 5 veces con la solución tamponada de lavado PBS-Tween. Para el lavado manual, aspirar los contenidos de los pocillos y a continuación rellenar cada uno de ellos con la solución tamponada de lavado. Evitar la contaminación cruzada de los pocillos, especialmente durante el primer lavado después de la aspiración. Drenar todo el tampón de lavado de los pocillos invirtiéndolos y después sacudiendo la solución residual fuera de los mismos con un movimiento brusco y seco de la muñeca. Repetir los pasos de llenado y drenaje hasta completar un total de 3 a 5 lavados. A continuación los pocillos se deben golpear vigorosamente sobre una toalla de papel u otro material absorbente para eliminar todas las trazas de tampón de lavado residual.
- 11. INTRODUCIR LA SOLUCIÓN SUSTRATO**

Introducir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo con la ayuda de un cronómetro para asegurarse de que los intervalos son regulares. La solución sustrato se debe añadir a los pocillos a un ritmo constante de manera que cada uno se incube durante exactamente el mismo periodo de tiempo (30 minutos). La solución sustrato en pocillos incubados con muestras positivas se volverán de color azul y la de pocillos con muestras negativas permanecerá incoloro o tomará una coloración azulada muy pálida.
- 12. INCUBAR LAS TIRAS** (durante exactamente 30 minutos a temperatura ambiente, o sea, entre 18 y 25° C)

Incubar a temperatura ambiente durante exactamente 30 minutos. Las tiras se deben proteger contra corrientes o cambios de temperatura durante el periodo de incubación.
- 13. INTRODUCIR EL REACTIVO DE PARADA**

Después de incubar el primer pocillo durante exactamente 30 minutos, añadir 100 µl de reactivo de parada a cada pocillo en el mismo orden y al mismo ritmo que se añadió la solución sustrato. Al añadir el reactivo de parada, la solución de sustrato azul se volverá amarilla y la solución incolora continuará sin cambios.
- 14. LEER LA ABSORBANCIA DE LOS POCILLOS**

La lectura de los pocillos se debe realizar en un espectrofotómetro de lectura de placas durante los 30 minutos siguientes a la adición del reactivo de frenado. La lectura de los pocillos se realiza a 450 nm contra el pocillo de control en blanco. Si se dispone de un espectrofotómetro de longitud de onda dual, la longitud de onda para el filtro de referencia se debe programar a 600-650 nm. La lectura de los micropocillos a 450 nm sin un filtro de referencia producirá unos valores de absorbancia mayores.

ASISTENCIA TÉCNICA: +1-916-363-2649

o correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com