

Inmunoensayo de la Enzima para la Determinación Cualitativa de Anticuerpos IgG contra los Antígenos Nucleares Extraíbles SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70 y Jo-1 (ENA-6) en Suero Humano

**Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos y en hospitales
Conservar entre 2°C a 8°C**

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de ENA-6

USO DESTINADO

Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra los antígenos nucleares extraíbles SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70 y Jo-1 (ENA-6) en suero humano.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad autoinmune sistémica se caracteriza por la presencia de circulación de auto-anticuerpos dirigidos a una amplia variedad de antígenos celulares. En los anticuerpos contra Sm (Smith) el antígeno está presente en el 25-40% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) y se consideran marcadores altamente específicos para esta enfermedad. Los anticuerpos contra Sm/RNP se detectan hasta en un 40% de los pacientes con SLE. Los títulos elevados de anti-RNP, en ausencia de otros autoanticuerpos, se correlacionan con la enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTO). Los anticuerpos contra SSA (Ro) están presentes en aproximadamente 60 a 70% de los pacientes con Síndrome de Sjögren y 30 a 40% de pacientes con SLE: Los anticuerpos contra SSA ocurren en aproximadamente el 60% de los pacientes con "ANA negativo", el 63% de los pacientes con lupus eritematoso cutáneo subagudo y en el 75% de los pacientes con una deficiencia similar al lupus eritematoso sistémico a partir de homocigotos C2. Los anticuerpos SSB (La) se encuentran en 11-24 % de los pacientes con SLE. También se consideran un marcador serológico para el síndrome de Sjögren y se detecta hasta en un 60% de estos pacientes. Los anticuerpos Scl-70 están presentes en aproximadamente el 20-33 % de los pacientes con esclerodermia, pero rara vez se ven en pacientes con desórdenes del tejido conectivo. Los anticuerpos contra Jo-1 están presentes en hasta el 35% de los pacientes con polimiositis y mucho menos común en la dermatomiositis. Los anticuerpos anti-Jo-1 son raros en otras enfermedades reumáticas.

Hasta hace poco, los laboratorios han detectado ENAs por inmunodifusión o contra inmunoelectroforésis. Estos métodos son relativos en tiempo e insensibles a los nuevos métodos. Los Inmunoensayo enzimáticos (EIA) tiene ventajas sobre estos métodos en términos de sensibilidad, especificidad, facilidad de automatización y el tiempo de entrega de pruebas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las muestras diluidas se incuban con antígenos ENA (SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70 y Jo-1) unidas a la superficie sólida de un pozo de microtitulación. Si los anticuerpos IgG contra cualquiera de estos antígenos están presentes en las muestras estas se unen aquí al antígeno correspondiente formando complejos antígeno-anticuerpo. Residuos de la

muestra se eliminan por aspiración y lavado. El conjugado (fosfatasa alcalina anticuerpo anti- IgG humano) es añadido y unido a estos complejos. El conjugado no unido es eliminado mediante aspiración y lavado. El sustrato es entonces añadido e incubado. En la presencia de la enzima ligada al sustrato es coloreado y convertido al producto final. La absorbancia de este producto final puede ser leído con un espectrofotómetro a 405 nm (600-630 nm de referencia).

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Tiras de micropozos cubiertos con antígeno ENA-6 (12 x 8)
2. Diluyente de muestra. 1 Frasco
3. Conjugado de la Enzima. 1 Frasco
4. p-nitrofenil fosfato. sustrato. 1 Frasco**
5. Calibrador Cut-off. 1 vial
6. Control Positivo Bajo. 1 vial
7. Control Negativo. 1 vial
8. Solución de paro. 1 Frasco
9. Concentrado de buffer de lavado 20x. 2 Frascos

***La solución del sustrato puede desarrollar un color amarillo pálido en el almacenaje.*

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl y 1.0 ml.
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:

1. Muestras, calibradores y controles deben manejarse como materiales con potencial riesgo biológico. Cada unidad de los donantes en el calibrador y controles pueden dar negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y anticuerpos contra el HIV-1 por la aprobación de la FDA en pruebas de tercera generación. Sin embargo, debido a que ningún método puede garantizar la completa seguridad de que el HIV -1, virus de Hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos materiales deben ser manejados en el Nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda para cualquier suero potencialmente infeccioso o muestra de sangre en el Manual Centers for Disease Control / Biosafely in Microbio-logical and Biomedical Laboratories", 1993.
2. Nunca pipeteé por la boca.
3. Evite el contacto con heridas en la piel abierta y membranas mucosas.
4. Algunos de los reactivos que contienen Proclin ®300 como conservador. Al eliminar los reactivos que contienen Proclin ®300, enjuagar los drenes con una cantidad abundante para diluir los componentes activos por debajo de los niveles activos.
5. Los reactivos que contienen azida de sodio:
 - a) **PRECAUCION:** Algunos reactivos de este equipo contienen



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

azida de sodio como conservador. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de azidas metálicas altamente explosivas de las tuberías de los drenajes. Para desecharlo, enjuague con un gran volumen de agua para evitar la acumulación, para más información consulte refiérase a “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts”, in the Manual Guide - Safety Management No. CDC- 22, issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Frases de riesgo de Sustancias Peligrosas en las Comunidades Europeas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)

- R28 – Muy tóxico por ingestión.
- R32 - El contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
- R50/53 - Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
- S1/2 - Mantenga bajo llave y fuera del alcance de los niños.
- S28 - En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente con abundante agua y jabón.
- S45 - En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (mostrar la etiqueta si es posible).
- S60 - Este material y / o su recipiente debe ser desechado como residuos peligrosos.
- S61 - Evítese su liberación al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales / Hojas de Datos de Seguridad.

b) La azida de sodio inhibe la actividad de la peroxidasa de rábano picante. Se debe tener cuidado para asegurar que la azida es llevada a más de otros reactivos en los pasos del conjugado y sustrato.

PRECAUCIONES ADICIONALES

1. No intercambiar reactivos de lotes diferentes de reactivos a excepción del Diluyente de la Muestra, Concentrado de Lavado, Sustrato y Solución de Paro.
2. No utilice los reactivos más allá de su fecha de caducidad. Las fechas de vencimiento están impresas en las etiquetas de los reactivos.
3. Almacenar los reactivos utilizados en 2-8° C.
4. Incubaciones por encima o por debajo de las temperaturas recomendadas a veces puede dar lugar a resultados erróneos.
5. El método de EIA es una técnica muy sensible. Mantener constante la técnica de pipeteo, tiempos de incubación, y las condiciones de temperatura durante todo el procedimiento de la prueba. La contaminación cruzada entre los reactivos pueden invalidar la prueba.
6. Los micropozos revestidos de antígeno deben de almacenarse con el desecante en la bolsa con sello previsto y regresar a refrigeración inmediatamente después de su uso.
7. (Manual de Procedimiento Únicamente) El procedimiento de lavado es muy importante y requiere una atención especial. (Por favor referirse a la sección de Procedimiento).

NOTA: los pozos con lavado inadecuado pueden producir resultados erróneos.

RECOLECCIÓN DEL ESPÉCIMEN Y MANEJO

La sangre entera debe ser obtenida por las técnicas médicas aceptadas. El suero se separa del coágulo y se almacena a una temperatura entre 2 y 8° C para corto plazo (hasta 7 días), o congelarse a -20° C para el almacenamiento a largo plazo. Evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Antes de la prueba, llevar los sueros congelados a temperatura ambiente lentamente y mezclar suavemente, evitando la formación de espuma. Las muestras que contengan partículas visibles deberán ser aclaradas por centrifugación antes de la prueba. Muestras muy contaminadas, hemolizadas, lipémicas, o ictericas no deben utilizarse.

PRECAUCIÓN: Las muestras de suero no deben ser inactivadas por calor antes de su uso.

PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

- Traiga todas las muestras y reactivos del equipo de prueba a temperatura ambiente (18 a 26°C) y mezcle cuidadosamente. Voltar suavemente los frascos de reactivos varias veces antes de usar. Regresar de inmediato al refrigerador después de su uso
- Prepare 1x de buffer de lavado. Prepare el buffer de lavado al añadir el contenido de la botella (50ml 20x) a un litro de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Prepare 1:101 diluciones del Calibrador De Punto-de-Corte, controles y muestras de pacientes en Diluyente de la Muestra. (por ejemplo, agregar 2µl de la muestra a 200µl de Diluyente de la Muestra o 5µl de muestra a 500µl de Diluyente de la Muestra). El Calibrador de Punto-de-Corte debe ser por triplicado.
2. Mezclar suavemente las diluciones de muestras con el dibujo y la expulsión en una punta de pipeta 2 o 3 veces, o por un mezclador de vórtice durante 2 o 3 segundos. Transferir 100µl de Calibrador de Punto-de-Corte diluido, controles y muestras de pacientes diluidas, a los pozos de antígeno. Evitar la formación de burbujas cuando se haga la transferencia de las muestras diluidas. *NOTA: Incluye un pozo, que contenga 100µl de Diluyente de la Muestra solamente en el reactivo en blanco. De esta manera podrán ser usados para el fotómetro “cero” antes de leer los resultados de la prueba.*
3. Permita que los pozos para incubación descubrirlos a temperatura ambiente (18 a 30° C.) durante 30 ± 5 minutos.
4. Aspirar o descartar el contenido de los pozos. Elimine cualquier exceso de humedad en los pozos invirtiendo la placa y golpeando firmemente con una toalla de papel. Lavar los pozos con 300µl de solución de lavado 3 veces. Retire el exceso de humedad de los pozos después de cada lavado. Cuando se utiliza una lavadora automática, siga las instrucciones del fabricante.
5. Ponga 100µl de Conjugado en cada pozo, evitando la formación de burbujas.
6. Permita que los pozos para incubación descubrirlos a temperatura ambiente (18 a 30° C) durante 30 ± 5 minutos.
7. Lavar los pocillos como se describe en el paso 4.
8. Ponga 100µl de Sustrato en cada pozo, evitando la formación de burbujas.
9. Permita que los pozos para incubación descubrirlos a temperatura ambiente (18 a 30° C) durante 30 ± 5 minutos.
10. Ponga 100µl de Solución de Paro en cada pozo, evitando la formación de burbujas.
11. Lea la absorbancia de los pozos a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 600-630 nm. La placa deberá leerse dentro de los 60 minutos de la adición de la Solución de Paro.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcular la absorbancia media del punto de corte del calibrador. Nota: Al calcular el promedio del valor de absorbancia del punto de corte del calibrador, excluir cualquier valor de absorbancia que se desvíe en más del 15 % del valor MEDIO de absorbancia. Calcular la media de los dos valores de absorbancia restantes. La exclusión de más de uno de los tres valores de absorbancia invalida la corrida.

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia media del Calibrador}} = \text{Valor del Índice de la muestra}$$

Ejemplo: Valores de absorbancia obtenidos del punto de corte del calibrador: 0.289, 0.288, 0.275 (después de la sustracción de blanco)

Absorbancia media del Calibrador de Punto-de-Corte = 0.277

Absorbancia de la Muestra = 1.570

Valor del Índice $1.570/0.277 = 5.86$

Procesadores Automatizados EIA (por ejemplo, MAGO® Plus Procesador Automático EIA), calcula e imprime los resultados de forma automática.

CONTROL DE CALIDAD

1. Cada vez que se realiza esta prueba, el Calibrador debe correrse por triplicado. Los Controles Bajos Positivo y Negativo deben ser incluidos en cada prueba corrida.
2. La absorbancia del Blanco debe ser $< 0,2$
3. El Valor de Índice del Control Positivo debe ser $\geq 1,1$.
4. El valor de Índice del Control Negativo debe ser $\leq 0,8$.
5. La absorbancia del Punto de Corte debe ser $\geq 0,10$

Si cualquiera de estos criterios no se cumplen, los resultados no son válidos, y la prueba debe repetirse.

NOTA: Cada lote de reactivos de ENA-6 se valida durante las pruebas de control de calidad usando los seis anticuerpos. Los seis anticuerpos no están representados en el punto de corte del calibrador. Controles adicionales pueden ser probados de acuerdo con las directrices o los requisitos locales, estatales, o federales o de las organizaciones acreditadas. Para obtener orientación sobre las prácticas adecuadas de control de calidad, por favor consulte a CLSI, antes NCCLS, documento C24- A2, Control Estadístico de Calidad Para las mediciones cuantitativas: Principios y Definiciones.

Valor de Índice	Interpretación
< 0.9	Negativo para anticuerpos anti-ENA IgG
0.91 a 1.09	Equívoco
> 1.10	Positivo para anticuerpos anti-ENA IgG

Cuando se obtienen los resultados ambiguos de muestras pueden ser reportados como una realización equivocada, volver a probar por otro método o a través de una nueva muestra, las muestras de equívocos que dan resultados positivos al ensayo repetido deberán ser reportadas como positivo. Muestras equívocas que dan resultados negativos en re-prueba debe ser reportado como negativo.

LIMITACIONES

1. Los resultados obtenidos con el equipo de prueba ENA-6 sirve sólo como una ayuda para el diagnóstico y no debe interpretarse como un diagnóstico en sí mismo. Los resultados deben ser interpretados en

conjunto con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.

2. La prueba debe realizarse en suero. El uso de sangre total o plasma no ha sido establecida.
3. Anticuerpos positivos para ENAs pueden encontrarse en individuos aparentemente sanos.
4. Las pruebas de detección son usadas para hacer pruebas de poblaciones enteras o subgrupos de poblaciones como la presencia de una característica. Un resultado negativo debe inferir que el individuo tiene una alta probabilidad de estar libre de la característica, mientras que un resultado positivo puede reflejar sólo la necesidad de realizar más pruebas.
5. El equipo de prueba ENA-6 no identifican el tipo específico de anti-ENA presente en una muestra positiva. Las muestras positivas deben ser probadas por anticuerpos individuales usando la prueba individual de anticuerpos ENA.
6. Las características de funcionamiento del equipo de prueba ENA-6 con equipos automatizados que no sea el Mago® y MAG® Plus EIA no se han establecido.

VALORES ESPERADOS

El valor esperado para un paciente normal es un resultado negativo. Sin embargo, el resultado positivo para autoanticuerpos se puede encontrar en algunos individuos aparentemente sanos. Sueros de paciente que contienen anticuerpos a esos antígenos representados en las pruebas de ENA-6 le dará resultados positivos que pueden ser evaluados más a fondo en pruebas específicas. El número de muestras positivas detectadas depende de la población que se esté probando. Los valores esperados en una población normal de donantes de sangre

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

El equipo de prueba ENA-6 fue evaluado con otro equipo de prueba comercialmente disponible en el mercado ENA. Ciento y cincuenta sueros de donantes de sangre normales y ochenta y ocho de los sueros de pacientes clínicos fueron probados por el equipo de pruebas ENA-6 y el método comparativo. La prueba se realizó en forma manual y con el MAGO® y MAGO® Plus con Procesadores Automatizados EIA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

	Manual			MAGO			MAGO PLUS		
	# de sueros	%	95% CI	# de Sueros	%	95% CI	# de sueros	%	95% CI
Sensibilidad Relativa	61/88	92.0	84.3-96.7	82/89	92.1	84.5-96.8	82/89	92.1	84.5-96.8
Especificidad Relativa	143/145	97.9	94.1-99.6	142/146	97.2	93.1-99.2	143/146	97.9	94.1-99.6
Acuerdo Total	224/234	95.7	92.3-97.6	224/235	95.3	91.8-97.6	225/235	95.7	92.3-97.9

* Cuatro muestras equívocas fueron excluidas de los cálculos; **Tres muestras equívocas se excluyeron de los cálculos. Diez sueros fueron discordantes en las pruebas manuales y con MAGO Plus, una muestra adicional fue discordante en la prueba con MAGO. Todas las muestras discordantes fueron probadas en 6 equipos de prueba ENA específicos disponibles en el mercado de anti-SSA, -SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70 y Jo-1. La resolución de las muestras discordantes son resumidas en la Tabla 2.

PRECISIÓN

La precisión del Equipo de Prueba ENA-6 fue determinada mediante pruebas de seis sueros diferentes, (2 negativos y 4 positivos) y el equipo de calibración y los controles por triplicado en dos corridas diferentes en tres días diferentes. La precisión se evaluó de forma manual y usando el

MAGO® y MAGO® PLUS procesadores automatizados EIA. La intra-e inter-ensayo de precisión se muestran en la Tabla 3.

Suero	General Media	Manual		MAGO		MAGO PLUS	
		% Intra	% Inter	% Intra	% Inter	% Intra	% Inter
A (Neg)	0.024	10.3	15.1	44.8	47.0	26.1	25.1
B (Neg)	0.044	4.7	9.3	10.1	28.6	5.8	15.3
C (Pos)	0.500	7.0	8.4	7.3	12.0	5.9	11.6
D (Pos)	0.927	4.0	10.4	7.1	11.0	6.3	8.3
E (Pos)	1.004	3.0	9.3	6.6	9.9	6.7	9.9
F (Pos)	1.488	4.9	8.5	6.7	10.4	4.9	7.9
c/o CAL	0.368	6.6	11.2	3.7	9.2	3.3	5.0
POS	0.487	3.1	7.7	5.6	9.1	3.6	7.0
NEG	0.060	9.0	12.9	18.1	23.0	10.7	13.7

REFERENCIAS

1. Craft, J. and Hardin, J. A. 1993. *Antinuclear Antibodies. In: Textbook of Rheumatology, Fourth Edition, W. B. Saunders Co., Philadelphia. p.164-187.*
2. Mattioli, M. and Reichlin, M. 1971. *Characterization of a Soluble Nuclear Ribonucleoprotein Antigen Reactive with SLE Sera. J. Immunol. 107: 1281-1290.*
3. Sharp, G. C., Irvin, W. S., Tan, E. M. et al. 1972. *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*
4. Wilson, M. R. and Nitsche, J. F. 1986. *Immunodiffusion Assays for Antibodies to Nonhistone Nuclear Antigens. In: Manual of Clinical Immunology, 3rd Ed., p.750-754, American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
5. Sontheimer, R. D., Maddison, P. J., Heichlin, M., Jordan, R. E., Stastny, P. and Gilliam, J. N. 1982. *Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus, Ann. Intern. Med. 97: 664-671.*
6. Provost, T. T., Amett, F. C. and Reichlin, M. 1983. *Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus and anti-Ro (SSA) Antibodies. Arthritis Rheum. 26: 1279-1282.*
7. Maddison, P. J., Skinner, R. P., Vlachoyiannopoulos, P., Brennan, D. M. and Hough, D. 1985. *Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA; Their Specificity and Interrelations in Connective Tissue Disease Sera. Clin. Exp. Immunol. 62: 337-345.*
8. Steen, V. D., Powell, D. L. and Medsger, T. A. 1988. *Clinical Correlations and Prognosis Based on Serum Autoantibodies in Patients with Systemic Sclerosis. Arthritis. Rheum. 31: (2) 196-203.*
9. Yoshida, S., Akizuki, M., Mimori, T., Yamagata, H., et al. 1983. *The Precipitating Antibody to an Acidic Nuclear Protein Antigen, the Jo-1, in Connective Tissue Diseases. Arthritis Rheum. 26, No. 5: 604-611.*
10. *Manual Guide - Safety Management No. CDC-22, "Decontamination 01 Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts", Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, April 30, 1976.*

Proclin® 300 es una marca registrada de Rohm and Haas Corp. Philadelphia, PA.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA