



COD 44775 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos ENA Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

ENA 4-PROFILE

Enzimoimmunoanálisis
PRUEBA EN MICROPLACA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos específicos para ENA del suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con un anticuerpo anti-IgG humanas conjugado con peroxidasa. Finalmente, se añade el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con H₂O₂, sustrato que da lugar a un producto soluble de color amarillo. La reacción enzimática se detiene con ácido sulfúrico y la formación de producto se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto en la reacción¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón Tris 2 mol/L, detergente no iónico 22 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. Diluyente de Muestra.** 125 mL. Tampón Tris 0,1 mol/L, cloruro de sodio 10 mmol/L, albúmina bovina 40 g/L, detergente no iónico 1,11 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4. Coloreado azul.
- C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-SSA (Ro).
- C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-SSB (La).
- C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-Sm.
- C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-Sm/RNP.
- C-. Control Negativo.** 2 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos anti-SSA (Ro), SSB (La), Sm y Sm/RNP, azida de sodio 15 mmol/L.
- D. Conjugado.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa. Coloreado amarillo.
- E. Sustrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
- M. Microplaca:**
 - 24 pocillos separables individualmente recubiertos con SSA(Ro) nativo. Color verde.
 - 24 pocillos separables individualmente recubiertos con SSB (La) recombinante. Color amarillo.
 - 24 pocillos separables individualmente recubiertos con Sm nativo. Color azul.
 - 24 pocillos separables individualmente recubiertos con Sm/RNP nativo. Color rojo.

Los sueros humanos utilizados en la preparación del control positivo, el control negativo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de Lavado: Efectuar una dilución 1/20 del Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada y mezclar. Se necesitan aproximadamente 50 mL de Tampón de Lavado para el lavado de una tira. Una vez diluido, el reactivo es estable 7 días a 2-8°C.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Aspirador multicanal o lavador automático de microplacas
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta con filtro de 450 ± 10 nm

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/100 en Diluyente de Muestra (B) antes del ensayo.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Abrir las bolsas de las tiras y montar la cantidad necesaria en el soporte para pocillos suministrado (Nota 1). Los colores identifican la especificidad de los antígenos inmovilizados en los pocillos.
3. Pipetear 100 µL de cada uno de los controles y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra (B) en un pocillo de cada color para el blanco.
4. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido y lavar los pocillos con 300 µL de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 4 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos como en el paso 4.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar las tiras durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 4).

12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm empleando el pocillo del blanco para el ajuste del cero. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Calcular la absorbancia del Valor Discriminante aplicando la siguiente fórmula:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Control Positivo} \times \text{Factor}$$

El valor del factor (F) viene indicado en la etiqueta del vial del Control Positivo.

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de absorbancia} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ de la Muestra}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ del Valor Discriminante}}$$

Cuando se obtengan valores de absorbancia por encima del límite superior del rango del lector de microplacas, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la operación.

VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con razón de absorbancia superior a 1,1.

Se consideran negativas las muestras con razón de absorbancia inferior a 0,90.

Los valores comprendidos entre 0,90 y 1,1 deben considerarse dudosos y se recomienda la repetición del ensayo.

Estos valores se dan únicamente a título informativo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El valor de absorbancia del blanco debe ser inferior a 0,4.

La razón de absorbancia para el Control Positivo debe ser superior a 1,1 y para el Control Negativo debe ser inferior a 0,90.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

- Especificidad: Los sueros de referencia "ANA Human Reference Sera" AF/CDC-2, AF/CDC-4, AF/CDC-5 y AF/CDC-7, del Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA, muestran resultados positivos al ensayarlos en pocillos de especificidad apropiada.
- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Interferencias: El factor reumatoide (300 UI/mL) no interfiere. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-SSA (Ro) es indicativa de Síndrome de Sjögren primario y de Lupus Eritematoso Sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente un 60-70% de pacientes con Síndrome de Sjögren y en un 40-50% de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico^{3,4}.

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-SSB (La) es indicativa de Síndrome de Sjögren primario y de Lupus Eritematoso Sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente un 10-40% de pacientes con Síndrome de Sjögren y en un 6-15% de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico^{5,6}.

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-Sm es indicativa de Lupus Eritematoso Sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente un 20-30% de pacientes con la enfermedad^{7,8}.

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-Sm/RNP es indicativa de Lupus Eritematoso Sistémico y de Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente un 30-40% de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico y en un 100% de pacientes con la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo^{7,9}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta únicamente el resultado de estos ensayos, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
2. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
3. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
4. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que debe pipetarse en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando Sustrato (E) en el paso 9.

BIBLIOGRAFÍA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. *Methods in Nonradioactive Detection*. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Press, 1997
3. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Gualis A and Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *British Journal of Rheumatology* 1993; 32: 449-455
4. Reichlin M and Scofield RH. SSA(Ro) autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. *Autoantibodies*. Elsevier, 1996.
5. Tzioufas AG and Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. *Manual of Biological Markers of Diseases*. Kluwer Academic Publishers, 1996.
6. Wahren M, Téngner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Hedfors E, Ringertz NR and Pettersson I. Ro/SS-A and La/SS-B antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 1998 Feb;11(1):29-38.
7. Peng SL and Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. *Autoantibodies*. Elsevier, 1996.
8. Bernstein R. Autoantibodies to histones, Sm and ubiquitins. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. *Manual of Biological Markers of Diseases*. Kluwer Academic Publishers, 1996
9. Van Venrooij WJ and Sillekens PTG. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1989; 7: 635-645