



COD 44775 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-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 los ENA (antígenos nucleares extraíbles) presentes en el suero se unen a los antígenos adsorbidos a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuban con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido y la formación de producto amarillo se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón fosfatos, azida de sodio 15 mmol/L.
- B. Diluyente de Muestra.** 100 mL. Tampón Tris, azida de sodio 15 mmol/L.
- C+. Control Positivo.** 1,8 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-SSA(Ro), anti-SSB(La), anti-Sm y anti-Sm/RNP, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 1,8 mL. Listo para su uso. Suero humano negativo para anticuerpos anti-SSA(Ro), anti-SSB(La), anti-Sm y anti-Sm/RNP, azida de sodio 15 mmol/L.
- CO1. Patrón de Valor Discriminante Anti-SSA (Ro).** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-SSA(Ro), azida de sodio 15 mmol/L. Calibrado frente al suero de referencia ANA Human Reference Serum AF/CDC7 de los Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA.
- CO2. Patrón de Valor Discriminante Anti-SSB (La).** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-SSB(La), azida de sodio 15 mmol/L. Calibrado frente al suero de referencia ANA Human Reference Serum AF/CDC2 de los Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA.
- CO3. Patrón de Valor Discriminante Anti-Sm.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-Sm, azida de sodio 15 mmol/L. Calibrado frente al suero de referencia ANA Human Reference Serum AF/CDC5 de los Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA.
- CO4. Patrón de Valor Discriminante Anti-Sm/RNP.** 1 mL. Listo para su uso. Suero humano con anticuerpos anti-Sm/RNP, azida de sodio 15 mmol/L. Calibrado frente al suero de referencia ANA Human Reference Serum AF/CDC4 de los Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA.
- D. Conjugado.** 15 mL. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG humana conjugadas con peroxidasa.
- E. Sustrato.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido fosfórico 4,5 %.
- PELIGRO: H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.*
- M. Microplaca:** 4 x 24 determinaciones: 3 módulos de 8 pocillos cada uno sensibilizados con SSA(Ro) (color rojo), SSB(La) (color azul), Sm (color amarillo) y Sm/RNP (color verde), altamente purificados.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

Los sueros humanos utilizados en la preparación de los patrones, del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los patrones y 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 del kit, 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 30 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 y filtro de 450 ± 10 nm.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Diluir las muestras 1/100 con Diluyente de Muestra antes del ensayo. Utilizar siempre diluciones frescas.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
3. Pipetear 100 µL de Control Positivo (C+), Control Negativo (C-), Control de Valor Discriminante (CO) y muestras diluidas en distintos pocillos.
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 3 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar los pocillos durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (Nota 5).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

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 y repetir la operación.

VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con razón de absorbancia superior a 1,2.

Se consideran negativas las muestras con razón de absorbancia inferior a 1,0.

Las muestras con razones comprendidas entre 1,0 y 1,2 deben considerarse dudosas y se recomienda la repetición del ensayo o la determinación de parámetros alternativos de valor diagnóstico.

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

CONTROL DE CALIDAD

La razón de absorbancia para el Control Positivo debe ser superior a 1,2 y la del Control Negativo debe ser inferior a 1,0.

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

- El kit ENA 4-Profile reconoce solamente anticuerpos específicos de SSA(Ro), SSB(La), Sm o Sm/RNP. No se han observado reacciones cruzadas con otros autoantígenos.
- Interferencias: La hemólisis (hemoglobina < 1000 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 3000 mg/dL) y la bilirrubina (< 40 mg/dL) no interfieren. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de niveles elevados de anticuerpos contra SSA (Ro) es indicativa de síndrome de Sjögren primario y de lupus eritematoso sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente el 60-70% de pacientes con síndrome de Sjögren y el 40-50% de pacientes con lupus eritematoso sistémico^{3,4}.

La presencia de niveles elevados de anticuerpos contra SSB(La) es indicativa de síndrome de Sjögren primario y de lupus eritematoso sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente el 10-40% de pacientes con síndrome de Sjögren y el 6-15% de pacientes con lupus eritematoso sistémico^{5,6}.

La presencia de niveles elevados de anticuerpos contra Sm es indicativa de lupus eritematoso sistémico. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente el 20-30% de pacientes con esa enfermedad^{7,8}.

La presencia de niveles elevados de anticuerpos contra Sm/RNP es indicativa de lupus eritematoso sistémico y de enfermedad mixta del tejido conectivo. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente el 30-40% de pacientes con lupus eritematoso sistémico y en el 100% de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo^{7,9}.

La sensibilidad y la especificidad para síndrome de Sjögren del kit de Anticuerpos ENA 4-Profile de BioSystems fue del 72,8% y 93,0% para anti-SSA(Ro) y 61,4% y 96,6% para anti-SSB(La), respectivamente, en un estudio con 190 muestras clínicas. Para lupus eritematoso sistémico, la sensibilidad fue del 51,4% y la especificidad del 95,8% para anti-Sm, y del 52,9% y 95,8%, respectivamente, para anti-Sm/RNP, en un estudio con 190 muestras clínicas. Para la enfermedad mixta del tejido conectivo, la sensibilidad fue del 96,7% y la especificidad del 95,8% para anti-Sm/RNP en un estudio con 150 muestras clínicas. Los detalles del estudio están disponibles bajo solicitud.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. No mezclar componentes de distintos lotes de kit.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
3. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
4. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
5. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el 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, 5th ed. AACCC Press, 2000.
3. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Guialis A, Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. British J Rheumatol 1993; 32: 449-455.
4. Reichlin M and Scofield RH. SSA(Ro) autoantibodies. En: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
5. Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. En: 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, 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;11(1):29-38.
7. Peng SL, Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. En: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Bernstein R. Autoantibodies to histones, Sm and ubiquitins. En: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
9. Van Venrooij WJ, Sillekens PTG. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. Clin Exp Rheumatol 1989; 7: 635-645.