

## INTENCIÓN DE USO

El kit autoanticuerpos Scl-70 IgG ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgG contra Scl-70 en suero o plasma humano.

## RESUMEN Y APLICACIÓN

Las enfermedades autoinmunes sistémicas se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos circulantes direccionados contra una amplia variedad de antígenos celulares. El Lupus Eritematoso Sistémico (SNL), comúnmente referido como Lupus, es la enfermedad autoinmune sistémica más conocida. Otras enfermedades del tejido conectivo son la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), el síndrome de Sjogren, la esclerodermia y la polimiositis / dermatomiositis. La mayoría de las mismas puede diagnosticarse clínicamente así como sus perfiles de anticuerpos frente a los distintos antígenos involucrados, que varían dsADN, Sm, RNP, Ro, La Scl-70, Jo1 e histonas. Por lo tanto, los inmunoensayos de autoanticuerpos son útiles para las evaluaciones de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad autoinmune. Los anticuerpos Scl-70 IgG reaccionan con la topoisomerasa I humana de 100 kd de peso molecular así como con su fragmento de 70 kd. Los anticuerpos Scl-70 están presentes en 20-40% de los pacientes con esclerodermia difusa y en aproximadamente el 20% de los pacientes con esclerodermia limitada. Los anticuerpos Scl-70 en ocasiones se presentan en el SLE sin aquellos rasgos clásicos de la esclerodermia, que pueden explicar la inesperada coexistencia de autoanticuerpos marcadores para SLE y esclerodermia. Algunos pacientes con esclerosis sistémica sílice-asociado (CDC) registran anticuerpos Scl-70.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgG específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgG específico en la muestra.

| MATERIALES PROVISTOS                                   | 96 Pruebas |
|--|------------|
| 1. Micropozos recubiertos con antígeno Scl-70          | 12x8x1     |
| 2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar) | 22 ml      |
| 3. Calibrador: 1 Vial ( listo para usar)               | 1 ml       |
| 4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)          | 1 ml       |
| 5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)          | 1 ml       |
| 6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)    | 12 ml      |
| 7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)            | 12 ml      |
| 8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)     | 12 ml      |
| 9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco                 | 25 ml      |

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenamiento sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución de lavado agregando el contenido del frasco (25 mx, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-23° C).

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C). Mezclar gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

## EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| Media del Calibrador O.D.  | 0.8 |
| Factor de Calibración (CF) | 0.5 |
| Valor Punto de Corte       | 0.4 |
| Control Positivo O.D.      | 1.2 |
| Anticuerpo Índice          | 3.0 |
| Muestra del Paciente O.D.  | 1.6 |
| Anticuerpo Índice          | 4.0 |

## CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

## INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de Scl-70; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

## INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de Scl-70 IgG por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de Scl-70 IgG por ELISA

## PERFORMANCE

### 1. Sensibilidad y Especificidad:

122 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 14 sueros resultaron positivos y 103 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 95%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

|                         | Scl-70 IgG ELISA |     |       |
|-------------------------|------------------|-----|-------|
|                         | +                | -   | Total |
| Kit ELISA de Referencia | 14               | 2   | 16    |
| -                       | 3                | 103 | 106   |
| Total                   | 17               | 105 | 122   |

### 2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

| Suero | No. de Réplicas | Media | Desvío Estandar | Coficiente de Variación % |
|-------|-----------------|-------|-----------------|---------------------------|
| 1     | 16              | 1.32  | 0.084           | 6.3                       |
| 2     | 16              | 0.69  | 0.051           | 7.4                       |
| 3     | 16              | 0.18  | 0.016           | 8.8                       |

Estudio Inter Ensayo

| Suero | No. de Réplicas | Media | Desvío Estandar | Coficiente de Variación % |
|-------|-----------------|-------|-----------------|---------------------------|
| 1     | 10              | 1.51  | 0.121           | 8.0                       |
| 2     | 10              | 0.74  | 0.081           | 10.9                      |
| 3     | 10              | 0.21  | 0.024           | 11.4                      |

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico
2. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

## REFERENCIAS

1. Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal J-L, Noell GS, Earnshaw WC, Rothfield NF. Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Immunol Immunopathol 1990; 57:399-410.
2. Hildebrandt S, Weiner E, Senecal J, et al. The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies. Arthritis Rheum 1990; 33:724-7.
3. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1988; 31:196-203.
4. Hildebrandt S, Jäckh G, Weber S, Peter H-H. A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies. Rheumatol Int 1993;12:321-4
5. Briggs DC, Vaughan RW, Welsh KI, Myers A, DuBois RM, Black CM. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. Lancet 1991; 338:661-2.
6. Mukai M, Sagawa A, Atsumi T, et al. 3 cases of anti-Scl-70 (topoisomerase I) antibody associated with central nervous system lupus without renal disorder. J Rheumatol 1993; 20:91594-7.
7. Stojanov L, Satoh M, Dooley MA, Kuwana M, Jennette JC, Reeves WH. Autoantibodies to topoisomerase I in a patient with systemic lupus erythematosus without features of scleroderma. Lupus 1995; 4:314-7.
8. Juarez C, Vila JL, Gelpi C, et al. Characterization of the antigen reactive with anti-Scl-70 antibodies and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay. Arthritis Rheum 1988; 31:108-15.