



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

**Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso

Autor: Erika Mariela Morocho Olmedo

Tutor: Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez

Riobamba- Ecuador

2020

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación bibliográfica de título: **“Requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso”**. Presentado por Erika Mariela Morocho Olmedo, dirigida por Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez, una vez escuchada la defensa oral y realizado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación, escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para el uso y custodia de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

Para la constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Mercedes Balladares Salto

Presidenta del tribunal



Firma

Mgs. Yisela Ramos Campi

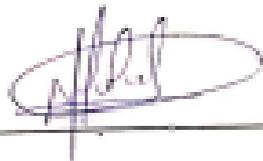
Miembro del Tribunal



Firma

Ing. Félix Falconi Ontaneda

Miembro del tribunal



Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, **Carlos Iván Peñafiel Méndez**, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: **Requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso**, propuesto por la Srta. **Morocho Olmedo Erika Mariela**, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 22 de noviembre de 2020



Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

DERECHO DE AUTORÍA

Yo, Erika Mariela Morocho Olmedo con C.I 060581409-4, soy responsable de las ideas, criterios, pensamientos y resultados expuestos en el presente trabajo de investigación y los de los derechos de autoría pertenecen a las prestigiosa Universidad Nacional de Chimborazo



.....
MOROCHO OLMEDO ERIKA MARIELA

CI: 0605814094

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar un cordial agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo que se ha convertido en nuestro segundo hogar a lo largo de estos años, a la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico que más que una profesión se ha convertido en nuestra vocación, a nuestros queridos docentes por impartir sus conocimientos que tras cuatro arduos años de formación académica han formado profesionales con ética.

De manera especial quiero agradecer a mi tutor que ha hecho posible esta investigación Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez por tutoriar el presente trabajo, por su paciencia y enseñanza que ha sido fundamental para poder llegar a cumplir mi meta profesional.

Erika Morocho

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo está dedicado principalmente a Dios y a la Virgen María, por permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A la memoria de mi abuelita Cecilia que ha sido la luz en mi camino y en mi corazón. A mis padres Galo Morocho y Magdalena Olmedo por ser el pilar fundamental para llegar a cumplir hoy un sueño más, por estar conmigo en todo momento gracias. A mis hermanos Carlos, Mario, Luis, Fernanda y Teresa por su cariño y apoyo incondicional, durante toda esta etapa de experiencias. A mis sobrinos Melany, Grace, Odalis, Cristina y Mateo porque son la alegría de mi vida.

Finalmente agradezco mis amigos por su apoyo en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, siempre los llevo en mi corazón.

Erika Morocho

RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es considerada una enfermedad autoinmune multisistémica de etiología multifactorial destacándose su predisposición genética y múltiples efectos de factores ambientales, que conducen a trastornos del sistema inmunológico innato y adaptativo sobre todo en mujeres en edad fértil. Por otra parte, el LES, su diagnóstico se basa en criterios clínicos e inmunológicos destacándose la presencia de anticuerpos antinucleares detectados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) además, de estudios de laboratorio como, hematología, química sanguínea y orina, en tal sentido, la IFI y ELISA quienes, unidos a criterios clínicos de la enfermedad, son métodos, simples, eficaces y de bajo costo necesarios para el diagnóstico, control y seguimiento del LES, es por ello de gran importancia determinar los requerimientos procedimentales para su diagnóstico en base a la literatura actual publicada, en donde se estudiaron los principales requerimientos y resultados esperados para su diagnóstico que son planteados por varios autores según revisiones sistemáticas, casos y control, estudios aleatorizados y no aleatorizados, estudios de cohorte y protocolos institucionales en idioma español e inglés de los últimos cinco años

PALABRAS CLAVE: Lupus, Enfermedades autoinmunes, Enzimoimmunoanálisis; Anticuerpos antinucleares, Inmunofluorescencia.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is considered a multisystemic autoimmune disease of multifactorial etiology, highlighting its genetic predisposition and multiple effects of environmental factors, which lead to disorders of the innate and adaptive immune system, especially in women of childbearing age. On the other hand, the diagnosis of SLE is based on clinical and immunological criteria, highlighting the presence of antinuclear antibodies detected by indirect immunofluorescence (IFI) and by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) in addition to laboratory studies such as hematology, blood and urine chemistry, in this sense, IFI and ELISA, which, together with clinical criteria of the disease, are simple, effective and low-cost methods necessary for the diagnosis, control and monitoring of SLE, it is therefore of great importance to determine the procedural requirements for its diagnosis based on the current published literature, in which the main requirements and expected results for its diagnosis were studied, which are raised by several authors according to systematic reviews, cases and control, randomized and non-randomized studies, cohort studies and institutional protocols in Spanish and English for the last five years.

Keywords: Lupus, Autoimmune diseases, Enzyme immunoassay; Antinuclear antibodies, Immunofluorescence.



Reviewed by: Armas Geovanny, Mgs.
Linguistic Competences Professor

URKUND

CERTIFICACIÓN

A **Morocho Olmedo Erika Mariela** con CC: **060581409-4**, estudiante de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**, Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado: **“Requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematosos”**, que corresponde al dominio científico **SALUD COMO PRODUCTO SOCIAL, ORIENTADO AL BUEN VIVIR** y alineado a la línea de investigación **SALUD**, cumple con el 8%, reportado en el sistema Anti plagio URKUND, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 18 de Diciembre de 2020



Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez

TUTOR

ÍNDICE

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL.....	II
CERTIFICADO DEL TUTOR.....	III
DERECHO DE AUTORÍA	IV
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA.....	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
URKUND	IX
ÍNDICE.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	XI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	12
INCLUSIÓN.....	12
EXCLUSIÓN.....	13
CAPÍTULO III. DESARROLLO	18
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA	32
ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de países con mayor producción científica sobre LES.....	18
Tabla 2. Síntomas por género	19
Tabla 3. Síntomas por grupos vulnerables.....	20
Tabla 4. Técnicas utilizadas para el diagnóstico del LES.....	22
Tabla 5. Comparación entre las técnicas IFI y ELISA.....	24

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Diagrama de flujo.....	17
--	-----------

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad de tipo inflamatoria, sistémica, crónica¹, de patogenia autoinmune, y de etiología desconocida caracterizada por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra autoantígenos, al mismo tiempo, por la presencia de complicadas aberraciones del sistema inmunológico que pueden dañar varios tipos celulares lo que explica la variabilidad de manifestaciones y compromiso orgánico².

Por un largo período de tiempo fue considerada una enfermedad rara, hoy su diagnóstico es frecuente en el medio hospitalario; quizás la presencia de factores étnicos, socioeconómicos, genéticos y/o medioambientales y a los criterios de inclusión utilizados permitan variaciones considerables en su incidencia y prevalencia entre continentes e incluso entre países de una misma región geográfica, sin embargo, diferentes estudios reportan una prevalencia en la población general entre cuatro y 250 casos por cada 100, 000 habitantes; en Norteamérica, Asia y en el norte de Europa afecta a 40 de cada 100, 000 habitantes, con una mayor incidencia entre la población hispana y afroamericana².

Su prevalencia en el Ecuador es un desafío clínico al depender principalmente de sus manifestaciones. Debido a su etiología desconocida presenta signos y síntomas impredecibles, de gravedad variable que pueden llevar a comprometer varios órganos y tejidos del organismo; sus apariciones varían de acuerdo con el paciente, por etnia, género y edad³. En la actualidad no existe una prueba considerada como el patrón para su determinación, por lo que se realizan procesos básicos para su diagnóstico de acuerdo a los protocolos establecidos para una diferenciación de LES con otras enfermedades con sintomatología similar; sin embargo, al aplicar técnicas especiales se pueden detectar cuadros clínicos de la enfermedad⁴.

Puede ocurrir a cualquier edad, aunque su mayor incidencia ocurre en edades reproductiva, entre los 15 y los 40 años de edad, con mayor frecuencia en mujeres con una proporción entre 8-10:1 en relación a los hombres lo que pudiera guardar relación con una respuesta más enérgica al propio antígeno⁵. Afecta más a individuos genéticamente predispuestos que han sido expuestos a determinados estímulos ambientales independientemente de la variabilidad fenotípica, sobre todo, por la contribución genética de su desarrollo en este sentido Deng y Tsao; Guerra y Vise citados por Veramend⁶ encuentran un patrón heredable

y mayor tasa de concordancia en gemelos monocigóticos que en dicigóticos o hermanos a partir de estudios de asociación de espectro genómico (GWAS - genome-wide association studies) mediante los cuales se han identificado 30 a 40 genes con polimorfismos que predisponen a la enfermedad.

Las evidencias anteriores señalan su etiología multifactorial y desconocida en tal sentidos, Mak y Tay⁷ hacen referencias a trastornos de los mecanismos inmunoreguladores con base genética, influencia hormonal y determinados factores exógenos entre los que se incluyen infecciosos y ambientales como posibles causas con particular importante el papel jugado por la luz ultravioleta y la presencia de determinados virus y uso de fármacos como son el caso de la hidralacina, la procainamida, la isoniacida, la metildopa y la clorpromacina como agentes inductores de la enfermedad. Sin embargo, las teorías actuales han propuesto una serie de sistemas y mecanismos relacionados con la fisiopatología de la enfermedad dentro de las que se destacan relacionadas la predisposición genética, mecanismos epigenéticos, factores relacionados con el genero, factores externos no infecciosos e infecciosos, fuentes de autoantígenos como la disfunción de la apoptosis y del aclaramiento de restos celulares, alteraciones del sistema inmunológico tanto del tipo innata como de tipo adaptativa, alteración del funcionamiento de sus células, formación de autoanticuerpos, también se señalan las citocinas, el sistema del complemento y el daño tisular en órganos diana con participación de autoanticuerpos⁸.

Lupus eritematoso

La enfermedad suele ser más severas en los hombres⁹, adolescentes, afrolatinoamericanos y mestizos entre 16 y 55 años; después de esta edad la enfermedad es más benigna, cursa con períodos de exacerbación y remisión de hasta más de un año; son frecuente manifestaciones específicas de tipo mucocutáneo con eritema malar localizadas en las mejillas, puente de la nariz, la frente, alrededor de los ojos, cuello y escote que pueden agravarse o exacerbarse por medio de la luz solar durante las primeras 24 h de la exposición, caída del cabello, úlceras en la mucosa oral o nasal y erupciones entre otras^{5,10}.

En tal sentido, al inicio de la enfermedad, es frecuente encontrarse signos clínicos aislados como artralgias o mialgias migratorias sobre todo en las articulaciones de manos y rodillas; tendinitis y tenosinovitis; neumonías graves e insuficiencia respiratoria, pericarditis, lesiones

valvulares cardíacas, hipertensión y daño renal importante; accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico transitorio, linfadenopatías, trastornos digestivos como hepatomegalia o trombosis de los vasos mesentérico^{5,10,11}.

Manifestaciones clínicas

Las afirmaciones anteriores sugieren el compromiso de todos los órganos y sistemas del cuerpo humano, de aquí que a más de ser una enfermedad atendida por la especialidad de reumatología las demás especialidades la tratan en dependencia de las manifestaciones clínicas a nivel mucocutáneo, del sistema musculoesquelético, renal, neuropsiquiátrico, cardiovascular, pulmonar, digestivo, oftalmológico, digestivo, hematológico, debilitando o modificando el sistema inmunológico y con ello la aparición o agravamiento de enfermedades infecciosas o neoplásicas^{1-3, 9-15,21}.

La inexistencia de manifestaciones clínicas o analíticas patognomónicas ha permitido al Colegio Americano de Reumatología (ACR) diseñar un conjunto de criterios de clasificación que son utilizados como instrumentos de diagnóstico mismos que fueron revisados y validados por la Systemic Lupus International Collaborating Clinics Group conocido por sus siglas en inglés SLICC (cuadro 1); por ello el paciente debe reunir cuatro criterios, de ellos, al menos uno debe ser clínico y otro inmunológico o presentar nefritis lúpica demostrada mediante biopsia en presencia de ANA o de anti- dsDNA¹², sin embargo, aunque el cumplimiento de estos criterios de clasificación implica la presencia de la enfermedad, en ocasiones, se da el caso de pacientes diagnosticados sin que cumpla un determinado conjunto de estos criterios¹³.

Cuadro 1. Criterios clínicos e inmunológicos del LES

Criterios clínicos	Definición
Erupción malar	Eritema fijo sobre la región malar que tiende a respetar los pliegues nasolabiales.
Erupción discoide	Erupción Eritematosa en parches con queratosis y oclusión folicular.
Fotosensibilidad	Erupción cutánea como resultado de una erupción inusual a la luz solar.

Úlceras orales	Laceraciones orales o nasofaringe usualmente indoloras.
Artritis	Artritis no erosiva que compromete dos o más articulaciones periféricas caracterizadas por sensibilidad a la palpación edema.
Serositis	a. Pleuritis b. Pericarditis
Compromiso renal	a. Proteinuria persistente mayor 0.5 gramos/día b. Cilindros Celulares, granulosos
Compromiso neurológico	a. Convulsiones b. Psicosis
Compromiso hematológico	a. Anemia hemolítica autoinmune b. Leucopenia < 4000 X mm ³ c. Linfopenia < 1500 x mm ³ d. Trombocitopenia < 100,000 mm ³

CRITERIOS INMUNOLOGICOS

ANA	Tiene una sensibilidad del 98-100% para el LES, pero bajo especificidad entre el 10 – 40% (hasta un 13% de la población sana puede tener ANA positivo en valor de 1:80; también se debe tomar en cuenta en otras enfermedad autoinmunes, reumatológicas, infecciones crónicas, enfermedades linfoproliferativos, medicamentos, y en adultos mayores); por tanto, se considera clínicamente relevante un título de ANA igual o superior a 1:160
Anti-dsDNA	Positivo mediante la utilización de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) con sustrato de <i>Crithidia luciliae</i> ¹⁴ . Niveles altos de anti-dsDNA, asociados a menudo a hipocomplementemia, se correlacionan con la actividad del LES, así como con la presencia de nefritis lúpica

Anti- Sm	Altamente específico para el LES, pero es hallado solo en 25% de los pacientes con LES ¹⁵ .
Anticuerpos antifosfolípidos (cualquiera de los siguientes)	Anticoagulante lúpico Anticardiolipina a título medio o alto (IgG , IgM ,IgA)
Patrones de fluorescencia de los ANA	El patrón homogéneo o difuso es un patrón producido por anticuerpos dirigidos contra las histonas. El patrón periférico es producido por anti-dsDNA cuyos antígenos pueden ser <ul style="list-style-type: none"> a. Anti-DNA nativo, relacionado con la estructura doble hélice del DNA, considerados los más específicos del LES b. Anti-DNA bicatenario que se dirige contra el esqueleto del DNA c. DNA monocatenario, desnaturalizado, que reaccionan contra las bases de los ácidos nucleicos. El patrón moteado o granular es un patrón de los anticuerpos contra la ribonucleoproteínas ¹⁶ .
Complemento bajo	C3 C4 CH50
Tes de Coombs directo	Positivo

Autor: Morocho Olmedo Erika Mariela (2020)

Fuente: Modificado de Systemic Lupus International Collaborating Clinics Group¹².

Biomarcadores para determinar Lupus eritematoso

Estudios realizados por Méndez, Hernández, Enríquez, et al¹⁷, encontraron que las alteraciones inmunológicas propias de la enfermedad incluyen autoanticuerpos, formación y deposición de complejos inmunes, mismos que se encuentran elevadas en sangre, quizás por ello, la elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG), presente en el 50-94% de pacientes, determinada por el método de Wintrobe y el método microhematocrito son

pruebas útiles, baratas y sencillas para evaluar la respuesta inflamatoria durante la fase aguda de varios padecimientos inflamatorios o sistémicos, pero considerado un indicador de actividad sensible pero poco específico¹⁸.

Otros autores como Turnier et al, le confieren gran importancia al examen de orina en busca de biomarcadores no invasivos para detectar actividad de la nefritis lúpica como son el caso de las proteínas que se elevan durante la enfermedad activa sobre todo la S100A4 que predice el daño renal¹⁹, al mismo tiempo la creatinina y la proteinuria en 24 horas también son un predictor de la actividad renal sobre todo por su relación con el filtrado glomerular, de tal forma que el aumento de la albumina y la proteína en 24 horas son pronosticas de la evolución de la enfermedad independientemente del tiempo de evolución de la enfermedad²⁰.

Los niveles de proteína C reactiva se encuentran elevados de forma moderada. Es frecuente encontrar hipoalbuminemia, Por ello los criterios resaltan la importancia de los estudios de laboratorio (cuadro 2) para establecer o descartar el diagnóstico, dentro de ellos, es de destacar la biometría hemática completa, el recuento plaquetario, el examen general de orina y la concentración sérica de creatinina o urea en la toma de decisiones médicas¹⁰.

Cuadro 2. Estudios de laboratorio

ANÁLISIS DE SANGRE

VSG	Elevada
Proteína C-reactiva	Frecuentemente normal o solo ligeramente elevada
Química sanguínea	Aumento de la creatinina Aumento de la urea en el suero (en nefritis lúpica); Hipoalbuminemia

ORINA

Orina	Proteinuria (en un 95 % de pacientes con nefritis lúpica; puede ser de carácter nefrótico) Hematíes dismórficos, cilindros eritrocitarios, leucocitarios y granulados (el denominado sedimento activo), Raramente hematuria ¹⁷ .
-------	--

Autor: Morocho Olmedo Erika Mariela (2020)

Fuente: Medicina Interna Basada en Evidencia¹⁰.

La presencia de autoanticuerpos (ANA), inmunoglobulinas que reaccionan con componentes propios, son una de las señas de identidad del LES caracterizada por su gran variedad, hasta 180 especificidades diferentes probablemente la cifra más alta dentro de las enfermedades autoinmunes, aunque sólo algunas son comunes¹⁶. Los autoanticuerpos más importantes se dirigen frente a antígenos nucleares. La mayoría de los pacientes presenta ANA en algún momento de la evolución. La detección de ANA constituye el hallazgo analítico más característico que la define debido a su positividad en un porcentaje alto de estos pacientes²¹, sin embargo, son inespecíficos ya que se pueden encontrarse en otras patologías autoinmunes órgano-específicas, de tipo infecciosa crónica, linfoproliferativos e incluso en un grupo de personas en las cuales se encuentran, ancianos, mujeres, familiares de primer grado de consanguinidad de paciente con padecimiento reumatológico y anticuerpos antinucleares positivo, por ello, la presencia aislada de ANA sin manifestaciones clínicas acompañantes no debe ser utilizada como prueba diagnóstica debido a su presencia en otras inmunopatías como el Síndrome de Sjögren, la Esclerosis Sistémica Progresiva y la Polimiositis, entre otras²².

Hargraves y colaboradores en la década del 40 del siglo pasado descubrieron la célula LE o célula del lupus al encontrar una célula fagocítica del sistema inmune, macrófago o neutrófilo, con la propiedad de fagocitar el material nuclear desnaturalizado de algún otro tipo de célula que les permitió señalar el carácter autoinmune de la enfermedad y mostrar la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del núcleo celular²³. Actualmente Soliman WM et al, encontraron una relación entre neutrófilos a linfocitos y la proporción de plaquetas a linfocitos como marcadores inflamatorios útiles para evaluar la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus; al mismo tiempo que refleja la posible afectación renal al encontrarse asociada con las diferentes clases de su estadificación histológica²⁴.

Estas pruebas disponen de una colección particular de anticuerpos que ayuda a establecer el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad, en relación a ello, la descripción de los diversos ANA, realizada a lo largo de la última década ha permitido establecer una colección de autoanticuerpos propios para enfermedades reumatológicas²⁵ de origen inmunológico

incluso con nuevas propuestas de reactivos como es el caso de la materia prima 15/174 de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para anticuerpos anti- dsDNA²⁶.

Otro tipo de anticuerpos antinucleares son los anti-ADN, los mismos son inmunoglobulinas dirigidas contra el ADN puro o en complejo con proteínas como lo son las histonas. Estos anticuerpos son un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas que tienen distintas especificidades, se clasifican en anti- ssDNA (ADN de cadena simple) y anti- dsDNA (ADN de cadena doble). Los anti- ssDNA son los anticuerpos que generalmente se identifican con mayor frecuencia, sin embargo, debido a su baja especificidad tienen muy poca relevancia clínica por ello, los anticuerpos anti- dsDNA, tienen mayor importancia clínica debido a su alta especificidad¹⁴.

Para la detección de estos anticuerpos se han desarrollado distintas técnicas especiales, entre ellas las más utilizadas son la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el organismo flagelado *Crithidia luciliae* también conocido como CLIFT²⁷, aglutinación por látex, y ELISA²⁸. Cada una de estas pruebas tiene distinta sensibilidad y especificidad, siendo la IFI la que presenta mayor especificidad (97,2%) y con mayor sensibilidad (70,6%). La prueba por ELISA presenta una sensibilidad intermedia (55,8%) con mayor especificidad (92,5%)²⁷.

Dentro de ellas se le considera a la inmunofluorescencia indirecta como la técnica más exacta por ser un examen de fácil realización (anexo 1), relacionada con la experiencia del observador, con una alta sensibilidad en la detección de anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-DNA, anti- dsDNA y anti-smith entre otros. Consiste en incubar suero del paciente en distintas diluciones, con células epiteliales humanas de estirpe neoplásica (células HEP-2) o tejidos sustrato (*Crithidia luciliae* o neutrófilos), montados en un portaobjeto³⁰.

Para la preparación del buffer se diluye un sobre de PBS en un litro de agua destilada y se agrega un frasco de tween 20, se agita suavemente. Para la preparación de la muestra (suero), se diluyen 990 ul de buffer con 10 ul de muestra (1:100), se homogeniza los tubos en el vortex por aproximadamente 5 segundos procediéndose a colocar 30 ul de suero diluido inmediatamente, asegurándose que coincida la ranura de la placa; se incuba durante 30 minutos. Se lava con el buffer, enjuagando la lámina previamente y luego dejándola por 5

minutos en el frasco Coplin. Se carga 30 ul de conjugado correspondiente al kit Hep 20-10 Euroimmun AG en cada cuadrante de placa Tray. Se coloca inmediatamente la impronta correspondiente asegurándose que coincida la ranura de la placa. Se incuba durante 40 minutos, protegiendo de la exposición a la luz. Luego se lava usando el buffer, enjuagando la lámina previamente, dejándola por 5 minutos en el frasco de Coplin. Se agrega una gota de glicerol y se coloca la lámina cubreobjetos. Se observa al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X. Sus resultados se expresan como positivos o negativos en dependencia de diferentes diluciones 1/40, 1/80, 1/160 de tal manera que a mayor dilución mayor será la posibilidad de afectación³⁰.

Otro procedimiento diagnóstico utilizado en la detección de autoanticuerpos es el método Enzyme Linked Immunosorbent Assay, de fácil procesamiento y generalmente automatizado lo que permite realizar un mayor número de exámenes, barato y menos operador dependiente. Más conocido como ELISA, por sus siglas en inglés; se basa en la unión antígeno-anticuerpo mediante la incubación del suero del paciente en un pocillo en cuyas paredes se encuentra adherido el antígeno específico, luego se lava quedando en el pocillo sólo los anticuerpos que se han unido al antígeno. Después se utiliza un segundo anticuerpo con sustrato colorimétrico dirigido contra la porción Fc de la Ig (anti IgG, IgM, IgA o polivalentes) que se uniría al anticuerpo del paciente produciendo una determinada intensidad del color que se traducen en mayor concentración sérica del autoanticuerpo²⁹.

Como hemos comentado, la composición de los ANA es muy heterogénea. Con las técnicas descritas, se detectan combinaciones variables de ANA pertenecientes a más de 100 especificidades antigénicas, no sólo nucleares, sino también citoplásmicas. Los antígenos reconocidos (cuadro 3) son sobre todo proteínas, complejos macromoleculares, complejos proteína-ácido nucleico y ácidos nucleicos. La mayoría de los ANA tienen como diana complejos proteína-RNA o proteína-DNA.

Cuadro 3. Principales autoanticuerpos para el diagnóstico y clasificación del LES

Autoanticuerpo	Sensibilidad en LES (%)	Especificidad en LES (%)	Presencia en otras enfermedades
ANA Hep-2, IFI	98	Baja	Variabilidad (15-25%)

Anti-dsDNA	70-80	95	Infrecuentes
Anti-histiona	50	Baja	LIF, SSc, Artritis juvenil
Anti-C1q	30	Baja	Sjögren
Anti Sm	30-40	70	Vasculitis por IC
Anti- Ro/SSA	40	Baja	Sjögren, LE Cutáneo, SSc
Anti-La/SSB	20	Baja	Sjögren
Anti- U1RNP	20	Baja	EMTC
Factores reumatoides	20	Baja	AR, Sjögren
Anticardiolipina IgG	20	Baja	SAP primario
Anticardiolipina IgM	10	Baja	SAP primario
Anticoagulante lúpico	10	Baja	SAP primario

Autor: Morocho Olmedo Erika Mariela (2020)

Fuente: Adaptado de Yaniv G et al³¹.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta. LIF: Lupus inducido por fármacos. SSc: Esclerosis sistémica. IC: Inmunocomplejos. EMTC: Enfermedad mixta del tejido conectivo. AR: Artritis reumatoide. SAP: Síndrome antifosfolípido.

Las afirmaciones anteriores presuponen que son los anti-dsDNA las claves para el diagnóstico y seguimiento del LES. Están presentes en el 70% (60-83%) de pacientes. Su especificidad alcanza el 95%-97%³¹. Si un test de ANA es negativo, no se suele indicar la realización de un test de anti-dsDNA, excepto si la sospecha clínica es elevada. Los anti-dsDNA poseen una especial utilidad para la confirmación del diagnóstico en pacientes con clínica sugestiva de la enfermedad.

La explicación detallada de las pruebas diagnósticas es imprescindible y necesaria dentro de cualquier centro de salud, hospital, clínica o laboratorio clínico. Su importancia radica en

lograr una adecuada interpretación de los resultados encontrados que corrobore o deseche un determinado diagnóstico que a su vez servirá para implementar un adecuado tratamiento y seguimiento de la enfermedad en caso de ser necesario; en el particular se destacan las pruebas de laboratorio de tipo inmunológico debido a la inexistencia de una determinada prueba para el diagnóstico del LES de tal manera, algunos pacientes pueden tardar un tiempo relativamente largo para ser detectados³², por ello nos hacemos la siguiente pregunta. ¿Cuáles serán los requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico?

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad cada vez más frecuentemente diagnosticada en nuestros hospitales, lo cual permite su tratamiento, seguimiento y control oportuno, es precisamente, el desarrollo alcanzado por los laboratorios clínicos en los diferentes procedimientos para su detección temprana quien ha permitido que deje de considerarse una enfermedad rara.

Estudios realizados muestran que no existe una prueba capaz de diagnosticar la enfermedad, sin embargo el avance vertiginoso relacionado con el papel de los anticuerpos antinucleares como criterios inmunológicos del LES como son los casos de Anti-dsDNA y Anti-Sm, los anticuerpos antifosfolípidos y la prueba de Coombs sin dejar a un lado aquellos exámenes de rutina que tanto informan sobre la enfermedad si se tienen en cuenta, de aquí la importancia de realizar esta revisión bibliográfica que permita ampliar conocimientos relacionados con estas técnicas así como conocer los avances actuales experimentados en torno a los criterios actuales de clasificación que admitan obtener herramientas adecuadas que eleven la calidad de vida de las personas enfermas.

Considerando esta problemática la presente investigación plantea como objetivo determinar los requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico, en base a la literatura actual publicada.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

La metodología utilizada durante la investigación se centró tanto en el método deductivo como en el inductivo en función de la búsqueda, estudio, selección y comparación de artículos científicos relacionados con la temática, para lo cual se tomó en cuenta las publicaciones aparecidas en bases de datos científicas de los últimos cinco años los mismos se concentran en las dos variables de estudio; independiente (requerimientos procedimentales y dependiente (Lupus Eritematoso Sistémico) de una manera armónica además, se adaptó el método científico en esta investigación desde el momento que la selección de la información se adquirió de diversas fuentes bibliográficas con un buen apoyo científico.

La población en estudio se conformó por la totalidad de 801 artículos científicos. Se abordó principalmente información referente a los requerimientos procedimentales para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, publicados en revistas indexadas en base de datos regionales y de impacto mundial entre las que se ubican Scielo, Google Académico, PubMed, Web of Science y Elsevier, publicadas durante el período comprendido entre el año 2015 y 2020.

INCLUSIÓN

Se incluyen en este estudio

- Publicaciones de los últimos cinco años en revistas indexadas, investigaciones, artículos científicos y revisiones bibliográficas tanto físicos como digitales.
- Artículos que hagan referencia a los requerimientos procedimentales para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.
- Artículos relativos al lupus eritematoso sistémico en niños, mujeres, hombres u ancianos.
- Artículos sobre Enfermedades autoinmunes.
- Artículos relacionados con técnicas de enzimoimmunoanálisis y anticuerpos antinucleares en el diagnóstico del LES.
- Artículos concernientes a anticuerpos antinucleares detectados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico del LES.

- Artículos referidos a ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en el diagnóstico del LES.
- Artículos que hagan referencia a estudios de laboratorio como, hematología, química sanguínea y orina en el diagnóstico del LES.
- Artículos publicados en idioma inglés o en idioma español.
- Artículos publicados durante el período 2015-2020.

EXCLUSIÓN

Fueron excluidos investigaciones.

- Artículos científicos y revisiones bibliográficas físicos como digitales en los cuales su contenido científico no presentaba contribución reveladora concerniente con el LES.
- Artículos que no contribuyeron con la información necesaria sobre requerimientos procedimentales para el diagnóstico de LES.
- Artículos de revistas y libros incompletos.
- Artículos que no estén fundamentados en reglamentos éticos de investigación.
- Artículos científicos, revisiones bibliográficas, tesis y libros tanto físicos como digitales publicados en sitios web que no tengan respaldo científico.
- Artículos que se encuentren fuera del límite de tiempo estipulado para ser tomados en cuenta.

ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA

El proceso de recopilación y selección de la información se realizó basado en conocimientos científicos sobre requerimientos procedimentales para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, a partir de aquí, los resultados nos proporcionaron: PubMed, Web of Science, Scielo, Elsevier, Google Académico.

Esta investigación utiliza el nivel descriptivo porque se obtuvo información relacionada con el LES, determinando los requerimientos procedimentales necesarios para su diagnóstico planteada en fuentes científicas.

El proyecto de investigación presenta un diseño bibliográfico ya que se logró la selección y recopilación de información valiosa sobre el tema, el mismo que fue sacado de libros, artículos científicos, revistas y revisiones sistemáticas.

El tipo de investigación es transversal desde el momento que se buscó la información relacionada con los requerimientos procedimentales para el diagnóstico del LES en la bibliografía revisada concerniente al período de junio-agosto del 2020.

Mediante un proceso de distinción y diferenciación se siguió un trayecto desde lo más simple a lo más complejo, para lo cual se consideró necesario aplicar el método analítico en la investigación con la finalidad de trazar un mismo camino (síntesis y análisis) que permita una mejor interpretación clara de su estructura, mientras que con el método inductivo se pudieron obtener conclusiones generales a partir de deducciones particulares distinguiéndose cuatro pasos esenciales: la búsqueda, análisis, exclusión, selección.

Para realizar la búsqueda bibliográfica se formuló como problema de investigación la determinación de los requerimientos procedimentales para el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico en base a la literatura actual publicada utilizando para ello las palabras lupus eritematoso sistémico, enfermedades autoinmunes, enzimoimmunoanálisis; anticuerpos antinucleares y diagnóstico utilizando operadores booleanos como AND, OR y NOT, en donde el uso de “AND” fue de mayor relevancia para obtener información más específica sobre el tema (cuadro 1). También se realizó la búsqueda de documentación en fuentes secundarias: libros, artículos de revisión, diccionarios, así como tesis y artículos de fuentes primarias, las cuales aportaron a la investigación, utilizando parámetros específicos

de búsqueda como: cronología, publicaciones en inglés y español, y utilización de sinónimos para ampliar la cobertura. Además, convirtiendo los resultados en gestores para futuras investigaciones en laboratorio clínico e histopatológico.

Inicialmente se buscaron artículos científicos procedentes de revistas indexadas tanto en idioma español como en inglés sobre requerimientos procedimentales para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, para lo cual se seleccionaron buscadores confiables de la web en el área de medicina, PubMed, Web of Science, Medline, Scielo, LILACS, Elsevier, JAMA, Redalyc y Google Académico. (ilustración 1)

Después de revisada la población estudiada y organizada la información se obtuvieron 801 artículos, de los cuales 246 pertenecen a PubMed; 220 a Scielo; 126 a Medline; 84 Elsevier; 78 a JAMA; 35 a Web of Science; 46 a Google Académico y 14 y 12 a Redalyc y LILACS respectivamente.

Fueron desechados 588 artículos que no tenían mayor aporte científico en la investigación debido a ser resúmenes o sin acceso por ser de pago, otros 135 por carecer de criterios éticos o ser publicados con una data superior a los cinco años también fueron eliminados. Finalmente, del total de 78 artículos considerados con valor para realizar la investigación fueron excluidos 26 por tema, resumen y conclusiones.

Para la selección de la muestra se realizó una revisión bibliográfica según criterios de inclusión ,52 artículos distribuidos de la siguiente manera: Scielo (19), Web of Science (9), PubMed (8), Elsevier (7), Google Académico (4), Redalyc (2), JAMA (2) y Medline (1) mismos que fueron analizados, parafraseados y citado con normas Vancouver.

La investigación es de tipo documental bibliográfica por lo cual no habrá ninguna interacción de la población utilizada. Una investigación con personas, grupos vulnerables o animales son un reto ético en cualquier investigación, en tal sentido, la población estudiada son personas con una determinada vulnerabilidad en su condición de salud, que de una u otra forma pueden salir dañadas por ser partícipe de una investigación, sin embargo, es necesario indagar, estudiar, analizar y conocer sobre ellas, en su defecto en la especie animal designada para tal objetivo.

Los documentos, revistas, artículos científicos tanto digitales como físicos se fundamentan en modelos y reglamentos éticos, para ello nos aseguramos de que aquella población que participó en las investigaciones poseyera las garantías necesarias de no verse afectada, ello, salvaguarda la propiedad intelectual de los autores, respecto a sus teorías y procedimientos mencionándolos y citándolos de manera correcta.

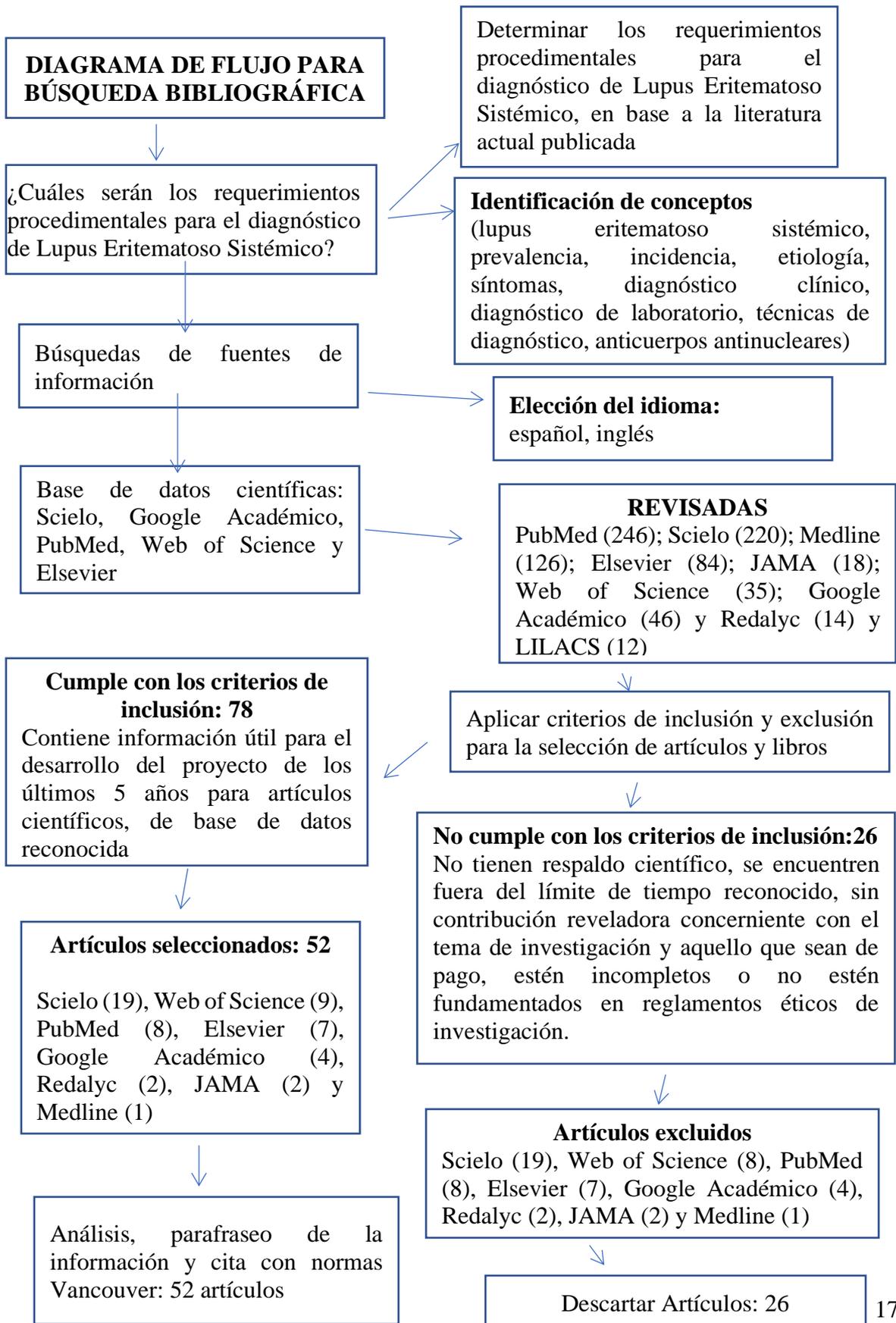


Ilustración 1. Diagrama de flujo

CAPÍTULO III. DESARROLLO

De conformidad con los objetivos de la investigación, fueron seleccionados 52 documentos procedentes de fuentes confiables de la web en el área de medicina; de acuerdo a la búsqueda bibliográfica, se identificó que el país con mayores artículos publicados en Cuba (15,38%), seguido por estados Unidos (11,53%) y España (7,69%), tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de países con mayor producción científica sobre LES.

Países	Publicaciones	Porcentajes
Ecuador	2	3.84
España	4	7.69
Cuba	8	15.38
Estados Unidos	6	11.53
Argentina	2	3.84
Alemania	1	1.92
Perú	3	5.76
Singapur	1	1.92
Chile	2	3.84
Egipto	1	1.92
Colombia	4	7.69
Israel	1	1.92
México	3	5.76
China	2	3.84
Países Bajos	1	1.92
Reino Unido	2	3.84
Paraguay	1	1.92
Canadá	1	1.92
Dinamarca	1	1.92
India	1	1.92
Serbia	1	1.92
Costa Rica	1	1.92
Varios de A. Latina	3	1.92
Total general	52	100,00%

Tabla 2. Síntomas por género

Género	Síntomas	Autor
Hombres	Fiebre, pérdida de peso o malestar general, debilidad, artralgias y/o mialgias en articulaciones de manos y rodillas, tendinitis y tenosinovitis; otros síntomas a tener en cuenta son: pleuritis, neumonías graves e insuficiencia respiratoria, lesiones cardíacas, hipertensión, daño renal y accidentes cerebrovasculares.	Albán J et al (2020)
Mujeres	Es frecuente encontrar en este tipo de pacientes debilidad, la fatiga, febrícula o fiebre y la pérdida de peso, también es frecuente manifestaciones de específicas de tipo mucocutáneo con eritema malar localizadas en las mejillas, puente de la nariz, la frente, alrededor de los ojos, cuello y escote que pueden agravarse o exacerbarse por medio de la luz solar durante las primeras 24 h de la exposición, caída del cabello, úlceras en la mucosa oral o nasal y erupciones entre otras.	Pons B et al (2018)

La tabla 2, muestra como el LES afectar a hombres y mujeres, en tal sentido, varios autores^{5,6,8} refieren que la enfermedad es más frecuente en el sexo femenino con una proporción de 8:1⁵, de tal manera, que las hace más vulnerable a la enfermedad. Ante estos hallazgos, podemos considerar de gravedad el impacto de la enfermedad sobre múltiples aspectos en estas personas debido a la prolongación de la enfermedad en la medida que comience a edades más tempranas³⁴.

Estudios realizados durante el año 2015 por Salen D et al³⁹ y durante los años 2015-2017 por el Grupo Latinoamericano de estudio del Lupus (GLADEL)³³⁻³⁵ encontraron síntomas constitucionales, como fiebre, pérdida de peso o malestar general frecuentes en hombres, sin embargo, la enfermedad tiene mayor prevalencia en mujeres jóvenes, afroamericanos, hispanos, caucásicos y asiáticos, siendo además más graves en estos grupos étnicos debido a factores genéticos, económicos y culturales.

De igual manera, en individuos con predisposición genética se produce una alteración del sistema inmunológico que conduce a una activación policlonal de células B y producción excesiva de autoanticuerpos frente a múltiples antígenos, sobre todo, componentes nucleares que intervienen en la variabilidad, impredecibilidad, recurrencia y renitencia de los síntomas, por demás, con fases de exacerbación o mayor actividad denominadas brotes, seguidos de períodos de remisión³⁶, por lo cual, la enfermedad afectará entre el 80 y 90% de las mujeres y el 10% de los hombres⁶; estudios realizados por Hermansen ML et al³⁷, en Dinamarca durante 1995-2011 y por Ress F et al³⁸, en Reino Unido durante el período 1999-2012 encontraron una prevalencia del 86% y una incidencia del 2,3 y del 4.91 por cada 100.000 a predominio femenino en cada estudio.

Tabla 3. Síntomas por grupos vulnerables

Grupo	Síntomas	Autor
Neonato	Se caracteriza principalmente por bloqueo aurículo-ventricular completo (BCC) o parcial, rash discoide, fotosensibilidad, hepatoesplenomegalia, miocarditis y pericarditis.	MSP (2013)
Niños y adolescentes	La presentación inicial incluye a menudo síntomas constitucionales inespecíficos, como fiebre, alopecia, fatiga, pérdida de peso y hepatoesplenomegalia	Pons B et al (2018)
Mujeres jóvenes	Pérdida de peso o malestar general, debilidad, fatiga, febrícula o fiebre y la pérdida de peso, también es frecuente manifestaciones de específicas de tipo mucocutáneo con eritema malar localizadas en las mejillas, puente de la nariz, la frente, alrededor de los ojos, cuello y escote	Prieto Yuste (2019)
Embarazadas	Síntomas leves. Enfermedad renal y mayor probabilidad de HTA y preeclampsia	Armas Merino R (2019)

Adultos mayores	Enfermedad cerebrovascular, enfermedad renal, manifestaciones cutáneas, manifestaciones pulmonares	Lloyd P et al, (2016)
-----------------	--	-----------------------

La tabla 3, muestra como el LES puede afectar a cualquier persona, de tal manera, que los hace más vulnerable a la enfermedad como es el comienzo inespecífico e insidioso en de niños y adolescentes, aunque con menor actividad, pudiendo encontrarse en gemelos monocigóticos o en aquellos con un patrón heredable⁶. Su espectro clínico no es muy diferente del observado en pacientes adultos jóvenes donde la enfermedad está caracterizada por presentar manifestaciones de tipo articulares, sequedad de ojos y boca con pocas afectaciones de las mucosas o de la piel y de órganos mayores, sobre todo en lo referente al daño renal, quizás la baja prevalencia de la enfermedad en estas edades, contribuye al retraso en su diagnóstico y correcto tratamiento al confundirla y/o tratarlas como otras enfermedades frecuentes en edad pediátrica^{10,11}.

En este sentido se destaca el estudio GLANDEL que reclutó 1480 pacientes multiétnicos (mestizos, afrolatinoamericanos, caucásicos y otros) diagnosticados dentro de los dos años del momento de inscripción en 34 centros latinoamericanos con experiencia en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad. El estudio del encontró efectos sobre la fisiología, el desarrollo y la esfera psicosocial de estas personas incluyendo, inicialmente, síntomas constitucionales inespecíficos como, fiebre, alopecia, fatiga, pérdida de peso y hepatoesplenomegalia también, durante el curso posterior de la enfermedad³³, al mismo tiempo, indican que la aparición de lupus tipo discoide reduce el riesgo de una mayor nefritis lúpica en pacientes con LES, independientemente de otros factores como la edad, la etnia, la actividad de la enfermedad y el daño orgánico³⁴.

Es en una mujer joven donde, generalmente, ocurren las manifestaciones típicas de la enfermedad, en este sentido encontramos toma del estado general, representado por artralgas o artritis, fiebre, úlceras en las mucosas, alopecia y lesiones cutáneas diversas; lo más frecuente durante este período es la fotosensibilidad y el eritema sobre las mejillas y el dorso de la nariz^{1,5,6,9,34}; durante esta etapa del crecimiento y desarrollo de la mujer puede ocurrir la influencia negativa del embarazo; en aquellas mujeres enfermas, las evidencias actuales hacen referencia a la posibilidad de una reactivación del LES relacionada al grado de actividad lúpica previo al embarazo, esta reactivación puede ocurrir en cualquier

momento del embarazo, pero es más frecuente durante el primer trimestre y el puerperio pudiendo aumentar la frecuencia de abortos, prematuridad o lupus neonatal¹

Cuando aparece en adultos mayores de 60, incluso de hasta 80 años, se encuentran manifestaciones articulares, pero menos frecuentes que en pacientes jóvenes. Los síntomas, durante este período, son difíciles de interpretar por la intervención de otras patologías propias de la senectud, sin embargo, es frecuente encontrar alrededor de los 50-60 años enfermedades de tipo cerebrovascular y renal relacionadas con la hipertensión arterial, manifestaciones cutáneas, pulmonares, xeroftalmía y queratoconjuntivitis^{34,35}.

Tabla 4. Técnicas utilizadas para el diagnóstico del LES

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Técnica utilizada	Resultados
Caracterización de citocinas y células efectoras reguladoras en la fisiopatología del lupus eritematoso cutáneo: un estudio transversal	Méndez Flores S, Hernández Molina G, Enríquez AB, et al	Exploratorio, observacional y transversal	35	ELISA Wintrobe Química sanguínea	Los niveles de VSG, de anticuerpos Anti-dsDNA, fueron más altos en pacientes con lupus eritematoso cutáneo en comparación con los pacientes con lupus eritematoso discoide.
Cocientes urinarios Proteína-Creatinina y Albúmina-	Laguarde M et al.	Análisis correlacional entre cociente Proteína/Creatinina en la	52	Proteinuria y albuminuria en orina de 24 horas	Mejor correlación P/C-24h para P24h \geq 300 mg/24h que para

Creatinina en pacientes con lupus eritematoso sistémico		primera orina de la mañana y Proteinuria de 24 horas (P/C-P24h).			P24h<300mg/24h
Importancia de los valores de proteinuria para el diagnóstico de la nefropatía asociada al lupus eritematoso sistémico	Blanco Mesa et al.	Estudio analítico transversal	60	Proteinuria en 24h	La proteinuria de 24 horas estimada de la razón proteínas/creatinina puede indicar la presencia de nefropatía lúpica incluso cuando el FG es mayor o igual que 60 mL/min/m ²
Determinación de VSG: comparación de los métodos de Wintrobe y microhematocrito	Márquez M y Chacón J	Descriptivo	407	Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) por el método Wintrobe	Técnica relativamente fácil. Los resultados son obtenidos en un período de tiempo corto y alta positividad.

La tabla 4 describe las técnicas utilizadas para diagnosticar el lupus eritematoso sistémico entre las que se destacan las de tipo convencional como la química sanguínea, el análisis de

orina en busca de proteínas y albumina, la velocidad de sedimentación globular hasta técnicas más específicas como la inmunofluorescencia y la ELISA. Investigadores como Laguarde y Mesa destacan la concentración de proteínas y albumina en orina como actividad del LES o daño renal, otros como Mendez y Márquez prefieren utilizar la técnica de ELISA para determinar por anti-dsDNA.

Aunque existe una variabilidad de investigaciones publicadas relacionadas con requerimientos procedimentales para el diagnóstico de lupus eritematoso, no existe un proceder que se encuentre validado para su predicción, quizás por ello, existen un conjunto de procedimientos realizados en el laboratorio que ayudan al médico a establecer o descartar su diagnóstico, tales como la biometría hemática, la velocidad de sedimentación, proteína C reactiva, la química sanguínea el recuento plaquetario y el examen de orina, la concentración sérica de creatinina o albúmina⁹.

Estudios realizados por Laguarde M et al⁴⁰ y Blanco Mesa et al⁴¹, encuentra que niveles altos de proteínas en orina expresan daño renal en pacientes enfermos de lupus eritematoso, incluso, con un filtrado glomerular mayor a 60mL/min/m², del mismo tiempo que la relación proteína creatina en 24 horas es más predictiva de la enfermedad. Otros resultados importantes son los obtenidos mediante la química sanguínea^{13,37} o los obtenidos mediante la Velocidad de Sedimentación Globular¹⁸ y la detección de anticuerpos por el método ELISA o inmunofluorescencia⁴².

Tabla 5. Comparación entre las técnicas IFI y ELISA.

Título	Autor	Tipo de estudio	de Población	Técnica utilizada	Resultados
Lupus Eritematoso Sistémico con Anticuerpos Antinucleares Negativo.	Vindas Angulo G, Salazar Arias N, Beita Jiménez J,	Revisión	18	IFI y ELISA	La ELISA no se recomienda a menos que exista una concordancia de más del 90% con el IFI

Revisión del Tema	Valverde Gómez M.				La ELISA debe ser confirmada por IFI de acuerdo a títulos y patrón Una discordancia entre IFI y ELISA se corresponde a un falso positivo.
Patrones de tinción de anticuerpos antinucleares identificados por Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con enfermedades del tejido conectivo	Oliva Menacho et al.	Cuantitativo , observacion al, descriptivo y transversal	291	IFI	Los anticuerpos antinucleares mediante IFI en línea se considera la prueba inicial de laboratorio que apoya el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes por su alta sensibilidad
Rendimiento diagnóstico de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra HTLV-1	Romero Ruiz S, Miranda Ulloa E, Briceño Espinoza R.	Observacion al prospectivo de evaluación	160	IFI utilizan do Hep-2	Mediante esta técnica se pueden determinar anticuerpos contra ds ADN, histonas, ARN, RNPn, SM, SS-A, SS-B, puntos nucleares, centrómeros, membrana

					nuclear, nucléolos (PM-SCL, fibrilación, ARN polimerasa I, NOR), SCL-70, ciclina I y II, fibras del huso, cuerpo de los centriolos. Anticuerpos contra ribosomas, Jo-1, mitocondrias, aparato de Golgi y actinia.
Ciento quince pacientes con lupus eritematoso sistémico: características clínicas e inmunológicas	Severiche Maury DM et al	Transversal	115	IFI utilizan do <i>Crithidia a lucillae</i>	Diluciones $\geq 1:20$ de Anticuerpos anti-ADN se encuentran en el 80% de pacientes con LES y se asocia con daño renal, sin embargo, anticuerpos anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro y anti-La con valores ≥ 20 U/ml no tiene asociación significativa con

Autoanticuerpos como biomarcadores de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico	Kokuina E.	Revisión sistemática	93	IFI ELISA	la enfermedad ni con el daño renal. Ambos métodos son útiles en la detección de los anticuerpos dsDNA en el LES. La IFI tiene una especificidad diagnóstica alta y la ELISA variable; ambas pueden dar resultados falsos positivos.
Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas	Méndez Rayo T et al.	Revisión sistemática	124	IFI	La Inmunofluorescencia indirecta (IFI), es un método accesible en muchos laboratorios y fácil de reproducir.
Consenso internacional sobre los patrones de ANA (ICAP): el camino lleno de baches hacia un consenso sobre la presentación de	Jan Damoiseaux et al	Taller internacional	1	IFI en células Hep-2	La introducción de células HEp-2 como sustrato para ANA IFI tiene la ventaja de obtener información sobre patrones

informes de resultados de ANA					nucleares y patrones de células citoplasmáticas y mitóticas.
Evaluación de la actividad de desoxirribonucleasa en muestras de suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico: método basado en fluorescencia versus ELISA	Vancevska A, Nikolic A, Bonacic Nikolic B, Skiljevic D, Radojkovic D	Ensayo clínico	31	IFI ELISA	El método basado en fluorescencia presenta una alta reproducibilidad, alta sensibilidad y un costo relativamente bajo, lo que podría proporcionar un complemento a los métodos actualmente disponibles

En la tabla 5, se muestra una comparación entre los métodos ELISA y la inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos en el diagnóstico de los Lupus Eritematosos Sistémico, en ella varios autores aceptan las bondades de la inmunofluorescencia indirecta como la más exacta

Bastías C, Sidgman F y Rodríguez C, hacen referencia al estudio práctico de las enfermedades inmunológicas en el laboratorio, la técnica de IFI en células HP-2 para observar distintos patrones de tinción fluorescente, y determinar la cantidad de autoanticuerpos, el patrón de fluorescencia y su ubicación nuclear y / o citoplasmática y, la técnica ELISA para detectar anticuerpos contra antígenos extraíbles asociados a ARN como Anti-SM, Anti-RNP, Anti-SSA (Ro), Anti-SSB (La), Anti Scl-70 y anti Jo-1⁴³.

La mayoría de los autores consultados están de acuerdo en utilizar la técnica de IFI en *Crithidia lucilae*²⁷, por ser un método de fácil reproducibilidad, alta sensibilidad y de un

costo relativamente bajo, además de poder proporcionar un complemento a los demás métodos al permitir determinar clases de anticuerpos anti-ADN y no producir reacción cruzada con anticuerpos anti-ssADN^{14,30,42,43}. Kokuina⁴³, plantea la utilización de los métodos ELISA e IFI son útiles en la detección de los anticuerpos ds-DNA en el LES, sin embargo, ello dependerá del método empleado, la utilización de la IFI si bien es útil para el diagnóstico por presentar una alta especificidad diagnóstica también produce con falsos positivos, para este autor es poco útil por ser una técnica semicuantitativa, con la utilización de la ELISA su valor clínico es variable pero alta para determinación de IgG de ahí su utilidad para monitorear la enfermedad.

La IFI tiene una especificidad diagnóstica alta y la ELISA variable; ambas pueden dar resultados falsos positivos. Otros autores^{27,46-49}, utilizan tanto la técnica de IFI como de ELISA para la determinación de anticuerpos antinucleares en el diagnóstico y seguimiento del lupus, por su parte Severiche et al⁴⁸ es un estudio transversal realizado en el año 2016 encontró diluciones por encima de 1:20 de anticuerpos anti-ADN en pacientes portadores de lupus controlado o con daño renal, sin embargo, las diluciones de otros anticuerpos como anticuerpos anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro y anti-La no se encontraban asociados con la enfermedad. En China, Li X, Liu X, Lui J, et al⁵⁰, realizaron un examen de rutina a 25.110 individuos encontrando una tasa de positividad del 14,01% a predominio del sexo femenino con predominio de los anticuerpos anti - Ro - 52, AMA - M2 y anti - SSA, por su parte, Guo BS et al⁵¹, en Baoding, China, utilizando la IFI encontró en una muestra de 1.970 individuos una mayor prevalencia de ANA en mujeres que disminuyó a partir de los 80 años, estos autores también encontraron los anticuerpos anti-Ro-52, anti-M2 y anti-SSA, como los más frecuentes

Sin embargo, la comunidad científica internacional, nacional y regional debe conocer que, por ahora, ninguno de los marcadores biológicos puede ser considerado un estándar de oro serológico en el diagnóstico, control y seguimiento de las exacerbaciones o posibles complicaciones de la enfermedad, pese a ello, en manos expertas pueden ser consideradas herramientas eficaces para pronosticar las exacerbaciones de la enfermedad. Por ello es imprescindible no limitarse a ellas y tener en cuenta los criterios del Systemic Lupus International Collaborating Clinics Group (SLICG)¹¹, aunque existen un subgrupo de pacientes con LES con niveles altos de anti-dsDNA, pero sin actividad clínica significativa, es decir, serológicamente activos pero clínicamente asintomáticos⁵².

CONCLUSIONES

La enfermedad de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) tiene una distribución universal, los estudios a nivel mundial son variables, sin embargo, determinar su incidencia y prevalencia es difícil debido a su presentación variable y a la circunstancia de que en su asistencia participan múltiples especialidades y niveles sanitario, sin embargo, las evidencias indican una mayor predisposición en mujeres jóvenes a razón de 8-9:1

Sus síntomas comunes son la fiebre, malestar general, debilidad y artralgias llegando a comprometer varios órganos y sistemas variando de acuerdo con el paciente, la etnia, género y edad, de tal manera, que en los hombres son frecuentes, además, las lesiones en órganos dianas mientras que, en las mujeres las manifestaciones específicas de tipo mucocutáneo agravadas por el sol son frecuentes.

En neonatos con lupus, es posible encontrar fotosensibilidad, bloqueos cardíacos y hepatoesplenomegalia; en niños y adolescentes a menudo son los síntomas constitucionales inespecíficos los más representativos. En embarazadas, cursa con síntomas leves, sin embargo, es posible encontrar enfermedad renal e hipertensiva, y en los ancianos asemejan patologías propias de la edad como las enfermedades cerebrovasculares y pulmonares.

Son la hematología y la bioquímica sanguínea junto al examen de orina los estudios iniciales necesarios ante un paciente con sospecha de LES; por su parte las técnicas inmunológicas apoyan el diagnóstico y clasificación de las enfermedades autoinmunes, entre ellas, se destacan la IFI y el ELISA

La utilización de la inmunofluorescencia indirecta como la técnica más exacta en la identificación de antígenos reconocidos por los autoanticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con LES como, anticuerpos antinucleares, anti- dsDNA y anti-smith, entre otros, por ser un examen de fácil realización y con una alta sensibilidad en relación con la experiencia del observador.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Guía práctica Clínica (Adopción LES Chilena) Quito: Ministerio de Salud Pública, Dirección Nacional de Normatización-MSP; 2013. Disponible en: www.salud.gob.ec
- 2 Bermúdez Marrero WM, Vizcaino Luna Y, Bermúdez MA. Lupus eritematoso sistémico. Acta Médica del Centro [Internet]. 2017 [citado 2020 julio 15]; 11(1). Disponible en: <http://www.revactamedicacentro.sld.cu/index.php/amc>
- 3 Tiao J, Feng R, Carr K, Okawa J, Werth VP. Using the American College of Rheumatology (ACR) and Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) criteria to determine the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). J Am Acad Dermatol [Internet]. 2016 [citado 2020 julio 15] ;74(5):862-869. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879000/>
- 4 Manchero L, A I, Manchero H. Eugenio Espejo [Internet]. 2019 [citado en 2020 julio 21] Dec; 7(12). Disponible en: Disponible en: <https://revistaeugenioespejo.org/index.php/ree/article/view/64>
- 5 Pons B, Bonfa E, Soriano E, Cardiel M, Izcovich A, Popoff F, et al. Primeras pautas latinoamericanas de práctica clínica para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico: Grupo Latinoamericano para el Estudio del Lupus. Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus. Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatología. Anals of the Rheumatic Diseases [Internet]. 2018 [citado en 2020 julio 21] jul.; 77(1). Disponible en: Disponible en: <https://ard.bmj.com/content/77/11/1549>
- 6 Veramendi Espinosa E. Perfil clínico y de laboratorio en el momento del diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. Hospital Nacional Arzobispo Loayza. 2009-2013. [Tesis de Grado]. Lima, Perú: Universidad Nacional de San Marcos; 2015 [Internet]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/4335>
- 7 Mak A, Tay S. Environmental factors, toxicants and systemic lupus erythematosus. Int J Mol Sci [Internet]. 2014 [citado en 2020 julio 21]; 15(9): p. 16043-16056. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4200809/#:~:text=Various%20env>

- [ironmental%20agents%20and%20toxicants.case%20series%2C%20case%2Dcontr
ol%20and](#)
- 8 Lloyd P, Doaty S, Hahn BH. Aetiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Systemic lupus erythematosus. Gordon C, Isenberg D, editors. First edition. Oxford University Press [Internet]. 2016 [citado en 2020 agosto 28]. p 7-22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1769989/>
 - 9 Albán Recalde J, Jácome Sánchez A, Trujillo Medina D, Sánchez Villarroel M. Debut de lupus eritematoso sistémico en paciente masculino. *Mediciencias UTA* [Internet]. 2020 [citado en 2020 jul 13]; 4(1). Disponible en: <https://medicienciasuta.uta.edu.ec/index.php/MedicienciasUTA/article/view/322>
 - 10 Armas Merino R. Lupus Eritematoso Sistémico en: *Medicina Interna Basada en la Evidencia 2019/20 (3ra Edic)*. In Merino RA. *Medicina Interna Basada en la Evidencia 2019/20*. Chile: Empendium Medycyna Praktyczna; 2019. p. 1727. Disponible en: <https://empendium.com/manualmibe/chapter/B34.II.16.3>
 - 11 Prieto J, Yuste J. Balcells. *La clínica y el laboratorio*. 23ª Edición España: ELSEIVER; 2019. Disponible en: https://www.academia.edu/40029911/Balcells_La_Cl%C3%ADnica_y_el_Laboratorio
 - 12 Otón Sánchez T. Nuevos criterios de clasificación de lupus eritematoso sistémico. *mpg Journal Rheum* [Internet]. 2019 [citado 2020 julio 20]; 2(45). Disponible en: <https://mpgjournal.mpg.es/index.php/journal/article/view/316>
 - 13 Aringer M, Dörner T, Leuchten N, Johnson SR. Toward new criteria for systemic lupus erythematosus-a standpoint. *Lupus* [Internet]. 2016 [citado en 2020 septiembre 8]; 25: 805-811. DOI: 10.1177 / 0961203316644338
 - 14 Abuaf N, Desgruelles C, Moumaris M, et al. Detección por citometría de flujo de autoanticuerpos anti-ADN y complejos inmunes de ADN circulante en lupus eritematoso. *J Immunol Res* [Internet]. 2019 [citado 2020 julio 21] Dic.:(2019: 6047085). Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2019/6047085/>
 - 15 Koruina E, González Y, Hernández D, Peña Y, Del Toro M. Optimización del algoritmo diagnóstico de anticuerpos antinucleares. *Revista Cubana de Medicina* [Internet]. 2018 [citado en 2020 julio 21]; 57(4): p. e403. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232018000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- 16 Acosta Colmán I, Ávila G, Acosta ME, Aquino A, Centurión O, Duarte M. Manifestaciones clínicas y laboratoriales en el Lupus Eritematoso Sistémico-LES. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. 2016 [citado en 2020 julio 21]; 14(1). Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v14n1/v14n1a14.pdf>
- 17 Urrego T, Ortiz Reyes B, Vanegas García AL, et al. Utility of urinary transferrin and ceruloplasmin in patients with systemic lupus erythematosus for differentiating patients with lupus nephritis. Reumatol Clin (Internet). 2019 (citado en 2020 jul 21); 16(1): p. 17-23. Disponible en: <https://www.reumatologiaclinica.org/es-transferrina-ceruloplasmina-orina-pacientes-con-articulo-S1699258X18300391>
- 18 Márquez J, Chacón Cardona M. Determinación de VSG: comparación de los métodos de Wintrobe y microhematocrito. Rev. Salud Pública [Internet]. 2016 [citado en 2020 agosto 12]; 18(6): p. 946-952. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/im156q.pdf>
- 19 Turnier J, Fall N, Thornton S, Witte D, Bennett M, Appenzeller S, et al. Proteínas S100 en orina como posibles biomarcadores de la actividad de la nefritis lúpica. Arthritis Res Ther [Internet]. 2017 [citado en 2020 agosto 21]; 19(1): p. 242-251. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5655804/>
- 20 Méndez Flores S, Tinoco Fragoso F, Hernández Molina G. Lupus eritematoso cutáneo, una entidad multidimensional. Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet]. 2015 [citado en 2020 agosto 12]; 53(6): p. 764-772. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/im156q.pdf>
- 21 Enríquez E, Kanaffo S, Lozano F. Protocolo diagnóstico ante la sospecha de lupus eritematoso sistémico. Protocolos de Práctica Asistencial [Internet]. 2017 [citado en 2020 jul 21] feb.; 12(25): p. 1463-66. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541217300057>
- 22 Rodríguez E. Anticuerpos en la enfermedad autoinmune sistémica. Revista de la Sociedad Val Reuma [Internet]. 2019 [citado en 2020 agosto 20]; 8(1): p. 6-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962016000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- 23 Fernandez Mesa T, Sánchez Martínez C, Junco Calzad R, González Rodríguez GD, Iglesias González I. Reumatol (Internet). 2016 [citado en 2020 julio 20]; 18 Supl (1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962016000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- 24 Soliman WM, Sherif NM, Ghanima IM, El-Badawy MA. Relaciones de neutrófilos a linfocitos y plaquetas a linfocitos en el lupus eritematoso sistémico: relación con la actividad de la enfermedad y la nefritis lúpica. *Reumatol Clin* [Internet]. 2020 [citado en 2020 septiembre 10]; 16 (4): 255-261. doi: 10.1016 / j. reuma.2018.07.008
- 25 Damoiseaux J, et al. Consenso internacional sobre los patrones de ANA (ICAP): el camino lleno de baches hacia un consenso sobre la presentación de informes de resultados de ANA. *Aspectos destacados de Auto Immun* [Internet]. 2016 [citado en 2020 agosto 24]; 7(1): p. 1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4733811/>
- 26 Fox BJ, Hockley J, Dolman C, Meroni PL, Ronnelid L. Un reactivo de referencia de la OMS para anticuerpos contra el lupus (anti-dsDNA): estudio colaborativo internacional para evaluar una preparación candidata. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2019 [citado en 2020 julio 21]; 78(12): p. 1677-1680. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6900249/>
- 27 Mendez Rayo T, Ochoa Zarate L, Posso Osorio I, Ortiz E, Naranjo Escobar J, Tobón G. Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Rev. Colomb. Reumatol* [Internet]. 2018 [citado 2020 agosto 6]; 25(2): p. 12-113. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-81232018000200112&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- 28 Aragón C, Llanos JA, Posso Osorio I, Nieto Aristizábal I, Perea Cardona N, Ortiz AF, Tobón G. Papel de las proteínas de alta movilidad (HMGB1) en el lupus eritematoso sistémico. *Revista Colombiana de Reumatología* [Internet]. 2020 [citado en 2020 julio 23] Mar; 27(1): p. 37-45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0121812319300568?via%3Dihub>
- 29 Fernández Matilla M, Grau García E, Fernández LlanIo Comella N, et al. Increased interferon-1 α , interleukin-10 and BLYS concentrations as clinical activity biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Med Clin* [Internet]. 2019 [citado en 2020 julio 21]; 153(6): p. 225-231. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30795903/>
- 30 Oliva Menacho JE, Arrollo Acevedo JL, Oliva Candela JA, García Hjarles MA. Patrones de tinción de anticuerpos antinucleares identificados por Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con enfermedad del tejido conectivo. *Rev Med Hered* [Internet]. 2017 [citado en 2020 agosto 22] ene./mar.; 30(1).

Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2019000100006

- 31 Yaniv G, Twig G, Shor DB, Furer A, Sherer Y, Mozes O, Komisar O, Slonimsky E, Klang E, Lotan E, Welt M, Marai I, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Auotimmun Rev* [Internet]. 2015[citado en 2020 septiembre 8]; 14: 75-79. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.003
- 32 González Álvarez Y, Pérez de Alejo Rodríguez L, León Medina A, Moré Chang CX, Alemán Zamora A. Marcadores inmunológicos humorales y su asociación con el estado psicoafectivo de pacientes con lupus eritematoso sistémico. *MEDISAN* [Internet]. 2017 nov [citado 2020 ago 28]; 21(11): 3251-3260. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017001100015&lng=es.
- 33 Pons-Estel GJ, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. Lupus in Latin-American patients: lessons from the GLADEL cohort. *Lupus* [Internet]. 2015 [citado 2020 sep 8];24(6):536-545. doi:10.1177/0961203314567753
- 34 Pons-Estel GJ, Aspey LD, Bao G, et al. Early discoid lupus erythematosus protects against renal disease in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal data from a large Latin American cohort. *Lupus* [Internet]. 2017 [citado 2020 sep 8]; 26(1):73-83. doi:10.1177/0961203316651740
- 35 Catoggio LJ, Soriano ER, Imamura PM, Wojdyla D, Jacobelli S, Massardo L, et al. Grupo Latino Americano De Estudio del Lupus (GLADEL). Late-onset systemic lupus erythematosus in Latin Americans: a distinct subgroup? *Lupus* [Internet]. 2015[citado 2020 sep 8]; 24: 788-795. doi:10.1177/0961203314563134
- 36 Ghodke Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* [Internet] 2015[citada en 2020 septiembre 8]; 64: 125-136. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4628859/>
- 37 Hermansen ML, Lindhardsen J, Torp-Pedersen C, Faurschou M, Jacobsen S. Incidence of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Denmark: A nationwide cohort study. *J Rheumatol* [Internet]. 2016 [citado en 2020 septiembre 8]; 43: 1335-1359. doi:10.3899/jrheum.151221

- 38 Rees F, Doherty M, Grainge M, Davenport G, Lanyon P, Zhang W. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in the UK, 1999-2012. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2016 [citado en 2020 septiembre 8]; 75: 136-141. doi: 10.1136 / annrheumdis-2014-206334
- 39 Salem D, Subang R, Laplante P, Levine JS, Rauch J. The dual role of innate immunity in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2015 [citado en 2020 septiembre 8]; 23: 1327-1331. <https://doi.org/10.1177/0961203314548248>
- 40 Laguarde M, Merino ME, Canaletti MC, Godoy AC, Melián Albín MB, et al. Cocientes urinarios Proteína-Creatinina y Albúmina-Creatinina en pacientes con lupus eritematoso sistémico *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* [Internet]. 2016 [citado en 2020 julio 21]; 50 (1): 5-10. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53546180003.pdf>
- 41 Blanco Mesa B, Santana Porbén S, Salabarría González JR. Importancia de los valores de proteinuria para el diagnóstico de la nefropatía asociada al lupus eritematoso sistémico. *Rev Cuba Reumatol* [Internet]. 2018 dic [citado 2020 sep 10]; 20(3): e641. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962018000300001&lng=es. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1469015>.
- 42 Jain S, Bose A, Bastia B, Sharma H, Sachdeva R, Jain AK, Pal R. La hemoglobina oxidada es antigénica e inmunogénica en el lupus. *Frente. Immunol* [Internet]. 2017 [citado en 2020 en agosto 22]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00732>
- 43 Bastías C, Sidgman F, Rodríguez C. Laboratorio de Inmunología en la práctica clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2015 [citado 2020 agosto 31]; 26(6): 764-775. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.005>
- 44 Vancevska A, Nikolic A, Bonaci-Nikolic B, Skiljevic D, Radojkovic D. Assessment of Deoxyribonuclease Activity in Serum Samples of Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Fluorescence-Based Method Versus ELISA. *J Clin Lab Anal.* [Internet]. 2016 [citado en 2020 agosto 28]; 30(6):797-803. doi:10.1002/jcla.21939. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6807242/>.

- 45 Kokuina El Autoanticuerpos como biomarcadores de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico. Rev. cubana med [Internet]. 2015 jun [citado 2020 Sep. 11]; 53(2): 201-223. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232014000200009&lng=es
- 46 Vindas Angulo G, Salazar Arias N, Beita Jiménez J, Valverde Gómez M. TEMA 2016: Lupus Eritematoso Sistémico con Anticuerpos Antinucleares Negativos: Revisión de Tema. Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR –HSJD [Internet]. 2016 [citado en 2020 agosto 30]; 6(3): 7. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/view/25734/26130>
- 47 Romero Ruiz S, Miranda Ulloa E, Briceño Espinoza R. Rendimiento diagnóstico de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra HTLV-1. Rev. Perú. med. exp. salud publica [Internet]. 2017 jul [citado 2020 Sep 8]; 34(3): 459-465. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342017000300012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2635>
- 48 Severiche Maury DM, Restrepo Escobar M, Restrepo Escobar LA, Vanegas García AL, Muñoz Vahos CH, Vásquez Duque GM. Ciento quince pacientes con lupus eritematoso sistémico: características clínicas e inmunológica. Rev colomb reumatol [Internet]. 2016 [citado en 2020 julio 8];21(4):183–192. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcrc/v21n4/v21n4a04.pdf>
- 49 La Rosa FCB, Lozano FVS. Prevalencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sanas. Lima-Perú. Rev Mex Patol Clin Med Lab [Internet]. 2017[citado en 2020 sep 8];64(1):8-13. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=72592>
- 50 Li X, Liu X, Lui J, et al. Epidemiological survey of antinuclear antibodies in healthy population and analysis of clinical characteristics of positivé population. J Clin Lab Anal [Internet]. 2020 [citado en 2020 jul 21] ene; 33(8): p. e22965. <https://doi.org/10.1002/jcla.22965>
- 51 Yan Ping G, Chun Guang W, Xin L, Yi Qian H, De Li G, Xing Zhuo J, et al. La prevalencia de anticuerpos antinucleares en la población general de China: un estudio transversal. Investigación terapéutica actual [Internet]. 2016 [citado en 2020 jul 21]; 76:116-119. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2014.06.004>

52 Rekvig OP. Lupus eritematoso sistémico: definiciones, contextos, conflictos, enigmas. Front Immunol [Internet]. 2018[citado en 2020 jul 21]; 9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839091/>

ANEXOS

Anexo 1. Inserto NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* Kits/Substrate Slides

NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* Kits/Substrate Slides Para Diagnóstico *In Vitro*

Código de Producto: 708200, 708205
508200, 508205.20, 508205.80

Complejidad de CLIA: Alto

Aplicación

NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* es un ensayo por inmunofluorescencia indirecta para el screening y la determinación semicuantitativa de anticuerpos anti-ADN de doble cadena (dsDNA) en suero humano. La presencia de anticuerpos anti-ADN de doble cadena puede ser utilizada en conjunción con otros tests serológicos y resultados clínicos para ayudar en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

Sumario y Explicación de la prueba

El test NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* es un test de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta que utiliza el hemoflagelado *Crithidia luciliae* como sustrato. Este organismo unicelular posee una mitocondria gigante que contiene una masa muy condensada de ADN de doble cadena circular.¹ Esta masa de ADN de doble cadena, conocida como cinetoplasto, parece estar libre de histonas u otros antígenos nucleares de mamífero.^{1,2} Esta masa hace la función de sustrato, sensible y específico, para la detección de autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena. Los autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena se presentan casi exclusivamente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y, como tales, se consideran anticuerpos marcadores. Los autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena han sido incluidos en los Criterios Revisados para la Clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico de 1982 por una subcomisión de la Asociación de Artritis y Reumatismo.³

Aunque el test de Anticuerpos Antinucleares (ANA) que se utiliza habitualmente es un método de screening sensible para la detección de LES y otras enfermedades del tejido conectivo, no es, de ningún modo, específico para el LES. En consecuencia, todas las muestras ANA positivas deben someterse a ensayos de anticuerpos específicos del ADN de doble cadena. La presencia de anticuerpos anti-ADN de doble cadena es muy indicativa de la existencia de LES; sin embargo, la ausencia de estos anticuerpos no permite siempre descartar dicha enfermedad.

Existe toda una serie de métodos para detectar los anticuerpos anti-ADN de doble cadena. Entre estos métodos se incluye la fijación del complemento⁴, la aglutinación pasiva⁵ y el RIA.⁶⁻⁸ La principal ventaja de los tests de ADN de doble cadena basados en el *C. luciliae* es su especificidad, debida a la naturaleza de la masa fuertemente enrollada de ADN de doble cadena circular en los cinetoplastos.⁹⁻¹¹ Esta característica es de vital importancia para los tests de anticuerpos marcadores.

Procedimiento de trabajo

En la técnica de inmunofluorescencia indirecta, las muestras se incuban con un sustrato de antígenos y posteriormente se lavan para eliminar los anticuerpos que no han reaccionado. El sustrato se incuba con un conjugado específico marcado con fluoresceína y posteriormente se lava para eliminar el reactivo que no se ha enlazado. Cuando se observan a través de un microscopio de fluorescencia, las muestras positivas para autoanticuerpos mostrarán una fluorescencia de color verde manzana en las áreas de la célula o del núcleo donde se ha enlazado el autoanticuerpo.

Reactivos

1. Portaobjetos de *Crithidia luciliae* (ADN de doble cadena), 6 o 12 pocillos/portaobjetos, con desecante

Kits solamente

2. Conjugado de anticuerpos anti-IgG humana (Cabra) sin Evan's azul, marcados con fluoresceína en tampón con un 0.09% de azida sódica
3. ADN de doble cadena positivo, 1 vial de tampón con un 0.09% de azida sódica y suero humano con anticuerpos anti-ADN de doble cadena, prediluido
4. Control Negativo para Sistemas IFA, 1 vial de tampón con un 0.09% de azida sódica y sin suero humano con anticuerpos anti-ADN de doble cadena, prediluido
5. Concentrado de PBS II (40x)
6. Medio de Montaje, 0.09% de azida sódica
7. Cubreobjetos

Advertencias

1. Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HBsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los ADN de doble cadena positivo y Control Negativo para Sistemas IFA deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso.
2. Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.
3. Se recomienda utilizar el equipo protector apropiado al trabajar con este kit.
4. Los reactivos derramados deben limpiarse inmediatamente. Siga las normas aplicables en su laboratorio acerca de la eliminación de residuos.

Precauciones

1. Este producto (kit) es para ser usado en el Diagnóstico *In Vitro*.
2. La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.
3. Un lavado incompleto o ineficiente de los pocillos puede dar lugar a un fondo elevado.
4. La adaptación de este ensayo para su uso en procesadores automáticos u otros aparatos de manipulación de líquidos, totalmente o en parte, puede producir diferencias en los resultados de la prueba respecto a los obtenidos con el procedimiento manual. Es responsabilidad de cada laboratorio el validar que su procedimiento automático produzca resultados dentro de unos límites aceptables.
5. Una gran variedad de factores puede afectar al rendimiento del ensayo. Entre estos factores pueden incluirse la temperatura de los reactivos al inicio del proceso, la potencia de la lámpara del microscopio, la fiabilidad y reproducibilidad de la técnica de pipeteo usada, las condiciones de lavado y la duración de los tiempos de incubación. Se requiere trabajar de una manera consistente para obtener resultados precisos y reproducibles.
6. Se recomienda seguir estrictamente el protocolo.

Condiciones de Almacenaje

1. Guardar todos los portaobjetos y reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente.
2. La solución de lavado diluida es estable 4 semana a 2-8°C.

Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. La adición de azida u otros conservantes a las muestras puede afectar adversamente los resultados. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Tras la recolección de las muestras de sangre, el suero debe ser separado del coágulo. El documento NCCLS (CLSI) H18-A3 recomienda las siguientes condiciones de almacenaje para muestras: 1) Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. 2) Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. 3) Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Una vez descongeladas las muestras deben agitarse bien antes de utilizarse.

Procedimiento

Materiales Suministrados (kits)

708200

- | | |
|----|--|
| 10 | 6- pocillos con sustrato dsDNA <i>Crithidia luciliae</i> |
| 1 | 4mL Conjugado de anticuerpos anti-IgG |
| 1 | 0.5mL ADN de doble cadena positivo |
| 1 | 0.5mL Control Negativo para Sistemas IFA |
| 1 | 25mL Concentrado de PBS II (40x) |
| 1 | 7mL Medio de Montaje |
| 1 | 10 Cubreobjetos |

708205

20	12-pocillos con sustrato dsDNA <i>Crithidia luciliae</i>
1	15mL Conjugado de anticuerpos anti-IgG
1	0.5mL ADN de doble cadena positivo
1	0.5mL Control Negativo para Sistemas IFA
2	25mL Concentrado de PBS II (40x)
1	7mL Medio de Montaje
1	20 Cubreobjetos

Material suministrado (portaobjetos)

508200.10	10 x 6- pocillos con sustrato dsDNA <i>Crithidia luciliae</i>
508205.20	20 x 12- pocillos con sustrato dsDNA <i>Crithidia luciliae</i>
508205.80	80 x 12- pocillos con sustrato dsDNA <i>Crithidia luciliae</i>

Material necesario no incluido

Micropipetas con capacidad para pipetear de 15 a 1000 μ L

Agua destilada o desionizada

Frascos lavadores o pipetas Pasteur

Cámara húmeda

Recipiente de 1L de capacidad (para diluir PBS II)

Cubeta de Coplin

Microscopio de fluorescencia con una emisión de fluorescencia de 495nm y un filtro de barrera de 515nm

Metodología

Antes de empezar

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente (20-26°C) y agitar.
2. **Diluya el concentrado de PBS II:** IMPORTANTE: Diluya el concentrado de PBS II a 1:40 añadiendo el contenido de la botella de concentrado de PBS II a 975mL de agua destilada o desionizada y mezcle completamente. El tampón de PBS II se utiliza para diluir las muestras de pacientes y como tampón de lavado. El tampón diluido puede almacenarse un máximo de 4 semanas a una temperatura de 2-8°C.
3. **Diluya las Muestras de los Pacientes:**
 - a. **Screening Inicial:** Diluya las muestras de los pacientes a 1:10 con un tampón de PBS II diluido (esto es, añada 100 μ L de suero a 900 μ L del tampón de PBS II).
 - b. **Titulación:** Realice series de diluciones dobles a partir de la dilución inicial de screening para todas las muestras positivas con el tampón de PBS II diluido (p. ej. 1:20, 1:40,... 1:640).

Procedimiento de Ensayo

1. **Preparación de los portaobjetos con sustrato:** Espere a que el portaobjetos con sustrato alcance la temperatura ambiente antes de extraerlo de su funda. Etiquételo y colóquelo en una cámara húmeda adecuada. Añada 1 gota (20-25 μ L) de control positivo y negativo sin diluir en los pocillos 1 y 2 respectivamente. Añada 1 gota (20-25 μ L) de la muestra del paciente diluida a los pocillos restantes.
2. **Incubación del portaobjetos:** Incube el portaobjetos durante 30 \pm 5 minutos en una cámara húmeda (una servilleta de papel humedecida colocada plana en el fondo de un recipiente cerrado de plástico o cristal le permitirá mantener las condiciones de humedad adecuadas). **No permita que el sustrato se seque durante el procedimiento de ensayo.**
3. **Lavado de los portaobjetos:** Tras la incubación, utilice un frasco de lavado o una pipeta para lavar suavemente el suero con el tampón de PBS II diluido. Oriente el portaobjetos y el chorro del tampón PBS II de forma que le permita evitar, en la medida de lo posible, que la solución pase por encima de varios pocillos a la vez. **Evite dirigir el chorro directamente sobre los pocillos para que no se dañe el sustrato.** Si está deseado, ponga los portaobjetos en un tarro de Coplin del almacenador intermedio diluido de PBS II por hasta 5 minutos.
4. **Adición de conjugado fluorescente:** Expulse el exceso de tampón PBS II. Sitúe el portaobjetos de nuevo en la cámara húmeda y cubra **inmediatamente** cada pocillo con una gota de conjugado fluorescente. Incube los portaobjetos durante otros 30 \pm 5 minutos.
5. **Lavado de los portaobjetos:** Repita el paso 3.
6. **Cubreobjetos:** Los procedimientos para los cubreobjetos varían de un laboratorio a otro; sin embargo, recomendamos el siguiente procedimiento:

- a. Sitúe un cubreobjetos en una toallita de papel.
- b. Aplique el medio de montaje siguiendo una línea continua en el borde inferior del cubreobjetos.
- c. Elimine el exceso de tampón PBS II y ponga en contacto del borde inferior del portaobjetos con el borde del cubreobjetos. Deje caer suavemente el portaobjetos sobre el cubreobjetos de forma que el medio de montaje fluya hacia el borde superior del portaobjetos sin que se formen burbujas de aire ni se queden atrapadas.

Control de Calidad

El ADN de doble cadena positivo y el Control Negativo para Sistemas IFA deberían ensayarse para cada portaobjetos con el fin de asegurar que todos los reactivos y los procedimientos se han llevado a cabo de la forma adecuada. Los controles adicionales de suero adecuados deberán prepararse alícuotando las mezclas de suero humano y almacenándolo a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Para que los resultados se consideren válidos, deben cumplirse todos y cada uno de los siguientes criterios. Si alguno de ellos no se cumple, el resultado del test se considerará inválido y el ensayo deberá repetirse.

1. El ADN de doble cadena positivo sin diluir debe ser $\geq 2+$.
2. El Control Negativo para Sistemas IFA debe ser negativo.

Interpretación de los Resultados

Reacción Negativa. Una muestra se considera negativa si la tinción específica del cinetoplasto es menor que la del control negativo. La tinción de otras estructuras, como el cuerpo basal, el flagelo o el núcleo sin tinción concomitante del cinetoplasto debe considerarse como negativa para la reactividad del ADN de doble cadena.

Reacción Positiva. Una muestra se considera positiva si se observa una tinción específica de los cinetoplastos o una tinción de los cinetoplastos y de los núcleos mayor que la del control negativo. Todas las muestras positivas deben valorarse utilizando series de diluciones dobles según el punto final.

Determine el patrón de tinción de cada muestra y pondere su intensidad de acuerdo con los siguientes criterios:

- 4+ Fluorescencia verde manzana brillante
- 3+ Fluorescencia verde manzana claro
- 2+ Fluorescencia positiva claramente visible
- 1+ La menor fluorescencia específica que permite diferenciar claramente una cinetoplastos de la fluorescencia de fondo



Limitaciones del Procedimiento

1. El usuario debe ser consciente de los efectos de un exceso de anticuerpos y de la posibilidad de obtener patrones de tinción diferentes de los del ADN de doble cadena al examinar los portaobjetos.
2. Varios factores externos influyen en la sensibilidad del ensayo, como pueden ser el tipo de microscopio de fluorescencia utilizado, la potencia y antigüedad de la lámpara, los aumentos utilizados, el sistema de filtros y la subjetividad del técnico.
3. Si se utiliza un filtro paso banda en lugar de un filtro de barrera 515, puede observarse un aumento de la tinción de los artefactos.
4. Para etiquetar los portaobjetos utilice solamente un lápiz. La utilización de cualquier otro instrumento de escritura puede ocasionar una tinción de los artefactos.
5. Todas las cubetas de Coplin que se utilicen en el lavado de los portaobjetos deben estar limpias de residuos de tinción. La utilización de cubetas de Coplin con residuos de tinción puede provocar la tinción de los artefactos.
6. Los resultados de este ensayo deben utilizarse conjuntamente con hallazgos clínicos y otras pruebas serológicas.
7. La funcionalidad del ensayo no ha sido establecida para matrices diferentes del suero.

Los portaobjetos comercializados por separado se clasifican como "reactivos específicos para los análisis".

Salvo que se trate de componentes del kit NOVA Lite[®] dsDNA *Cntrichidia lucillae*, las características analíticas y de rendimiento no están establecidas.

Valores Esperados

El sustrato del kit NOVA Lite® dsDNA *Crithidia lucillae* fue utilizado para ensayar una serie de muestras de pacientes con enfermedades del tejido conectivo, así como 200 muestras aleatorias de donantes de sangre. Los resultados se muestran a continuación:

Grupo de pacientes	Número	Número de positivos con NOVA Lite® dsDNA <i>Crithidia lucillae</i>
LES	105	42
Lupus inducido por la medicación	24	0
Artritis reumatoide	40	0
Escleroderma	24	0
Dermatomiositis	14	0
Síndrome de Sjogren	14	0
Normales	200	0

Referencias

1. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE: Immunology of DNA. III. *Crithidia lucillae*, a simple substrate for the detection of anti-dsDNA with immunofluorescence techniques. *Ann. NY Acad. Sci.* **254**: 505-515, 1975.
2. Crowe W, Kusher I: An immunofluorescent method using *Crithidia lucillae* to detect antibodies to double-stranded DNA. *Arthritis and Rheumatism* **20**: 811-814, 1977.
3. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25**: 1271-1277, 1982.
4. Arana R, Seligmann M: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **46**: 1867-1882, 1967.
5. Inami YH, Nakamura RM, Tan EM: Microhemagglutination test for the detection of native and single-stranded DNA antibodies and circulating DNA antigen. *J. Immunol. Methods* **3**: 287-300, 1973.
6. Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER, et al.: Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence. *Scand. J. Rheu. Suppl.* **11**: 12-19, 1975.
7. Fish F, Ziff M: A sensitive solid phase microradioimmunoassay for anti double-stranded DNA antibodies. *Arthritis and Rheumatism* **24**: 534-543, 1981.
8. Pincus T, Schur P, Rose JA, et al.: Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus. *The New England J. of Medicine* **281**: 701-705, 1969.
9. Somerfield SD, Roberts MW, Booth RJ: Double-stranded DNA antibodies: comparison of four methods of detection. *J. Clin. Path.* **34**: 1032-1035, 1981.
10. Sontheimer RD, Gilliam JD: An immunofluorescence assay for double-stranded DNA antibodies using the *Crithidia lucillae* kinetoplast as a double-stranded DNA substrate. *J. Lab Clin. Med.* **91**: 550-558, 1978.
11. Stingl G, Meingassner JG, Swetty P, Knapp W: An immunofluorescence procedure for the demonstration of antibodies to native, double-stranded DNA and of circulating DNA-ant DNA complexes. *Clin. Immunol. Immunopath.* **6**: 131-140, 1976.
12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2009

Fabricante:

NOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America
Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

628200ESP

December 2012
Revision 16



NOVA Lite® e INOVA Diagnostics, Inc., son marcas comerciales registradas. Copyright 2012 © Todos los derechos reservados

Anexo 2. Antinuclear antibodies Hep-2 (ANA-HEP-2)

ElfoSystems



ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES HEP-2 (ANA-HEP-2)

COD 44108 24 determinaciones	COD 44508 60 determinaciones	COD 44509 120 determinaciones
COD 44546 10 x	COD 44547 10 x	
CONSERVARLA 2-8°C		
Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-nucleares Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico		

ANTICUERPOS ANTI-NUCLEARES HEP-2 (ANA-HEP-2) Inmunofluorescencia Indirecta CÉLULAS HEP-2

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en las células HEP-2. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

	COD 44108	COD 44508	COD 44509
A. Portaobjetos	4 x 6 pocillos	10 x 6 pocillos	10 x 12 pocillos
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Cont. Posit. ANA-HEP-2	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Control Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 mL	1 x 3 mL	2 x 3 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel secante	1 x 4	1 x 10	1 x 10

	COD 44546	COD 44547
A. Portaobjetos	10 x 6 pocillos	10 x 12 pocillos

COMPOSICIÓN

- A. Portaobjetos:** Células HEP2 cultivadas en cada pocillo.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, sulfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, ácido de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Control Positivo ANA-HEP-2:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón homogéneo, ácido de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo:** Suero humano, ácido de sodio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, ácido de sodio 0,95 g/L.
- E. Mounting Medium. Medio de Montaje:** Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, ácido de sodio 0,95 g/L.
- F. Papel secante.**

Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBe 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 reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evita la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en el cultivo de células.

REACTIVOS AUXILIARES

- B. PBS (10x).**
- D. IgG FITC/Evans, conjugado con controlación de azul de Evans.**
- E. Mounting Medium. Medio de Montaje.**
- C+. Control Positivo ANA-HEP-2.**
- C+. Control Positivo ANA-Sp:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón moteado, ácido de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Nu:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón nuclear, ácido de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control Positivo ANA-Ce:** Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón centómero, ácido de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control Negativo.**

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 semana a 2-8°C.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtro de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

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

Diluir las muestras 1/50 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/150.

Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

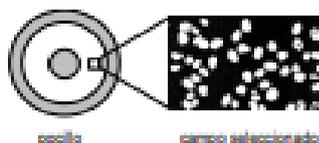
PROCEDIMIENTO

- Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
- Depositar una gota (25 µL) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
- Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
- Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
- Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo) (Nota 2).
- Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.

7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
8. Depositar una gota de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar las células con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo. Seleccionar campos con distribución de células e intensidad de fluorescencia uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada.

— **ANA:** Existen diferentes patrones de fluorescencia nuclear que pueden coexistir en un mismo suero e incluso modificarse con la dilución del mismo. Los principales patrones anti-nucleares son:

Homogéneo: Fluorescencia uniforme y homogénea en todo el interior del núcleo de la célula en interfase. Fluorescencia intensa en las células en mitosis.

Periférico: Marcaje en la periferia del núcleo, de mayor intensidad en el perímetro interior, y marcaje homogéneo en el resto del núcleo.

Moteado: Marcaje fluorescente en forma de gránulo grueso. Los nucleolos no están marcados. Los gránulos pueden tener tamaños y formas diversas dependiendo del antígeno que reacciona.

Nucleolar: Existen dos patrones nucleolares: a) Marcaje nucleolar de patrón homogéneo. A menudo acompañado de un débil marcaje homogéneo en el resto del núcleo. b) Marcaje moteado de los nucleolos en células en interfase. Marcaje puntual de las regiones organizadoras de los cromosomas mitóticos.

Centromérico: Punteado discreto en las células en interfase (48 puntos o múltiples). Los puntos se alinean con los cromosomas en las células en mitosis.

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cuando no se observa ninguno de los marcajes específicos descritos, el resultado es negativo para los anticuerpos indicados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (C+) y el Control Negativo (C-) suministrados con los kits cod 44108, cod 44508 y cod 44509 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo no debe proporcionar marcaje específico alguno.

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 conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmuglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo ANA-HEp-2 está verificada frente al suero de referencia AFICDC1 de los Centers for Disease Control.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: La determinación de anticuerpos anti-nucleares tiene una sensibilidad superior al 95% para el lupus eritematoso sistémico, y una baja especificidad².

Homogéneo: Indicativo de lupus eritematoso sistémico.

Periférico: En pacientes con enfermedades del tejido conectivo.

Moteado: Asociado al lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, polimiositis o esclerodermia.

Nucleolar: En aproximadamente un 50-70% de pacientes con solapamiento de esclerodermia y polimiositis/dermatomiositis. Se presenta en hasta un 33% de pacientes con esclerodermia sistémica, especialmente con complicaciones renales².

Centromérico: En pacientes con esclerosis sistémica, especialmente en la forma de la enfermedad con implicación cutánea (80%). Ocasionalmente, en otras enfermedades conectivas².

El kit BioSystems anticuerpos anti-nucleares fue usado para determinar 140 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, síndrome de CREST, dermatopolimiositis, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune y cirrosis biliar primaria), así como donantes sanos. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad diagnóstica para el conjunto de enfermedades autoinmunes del 98,3% y 93%, respectivamente.

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1983.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. En: James S. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1998.
3. Foltz MJ, Raitner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. En: Konrad K, Humbal RL, Maurer M, Shonfeld Y and Tam EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.

Anexo 3. Sistema de pruebas ANA Screen



Sistema de pruebas ANA Screen

REF Z229001G/5MZZ29001G



APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS es un análisis cualitativo de sustrato diseñado para detectar anticuerpos antinucleares (AAN) en sueros humanos. Cuando se realiza de acuerdo con estas instrucciones, este kit es capaz de detectar todos los AAN comúnmente estudiados, tales como aquellos contra ADN de doble filamento (ADNdf), Jo-1, Sm, Sm/RNP, SSA, SSB y Scl-70. La prueba también es capaz de detectar AAN que muestran patrones de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (AIF) del centrómero, nucleolares, periféricos y homogéneos. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

En años recientes, se ha hecho evidente que los autoanticuerpos contra un número de constituyentes nucleares han probado ser útiles en el diagnóstico de varias enfermedades del tejido conectivo. Los anticuerpos contra el ADNdf son altamente específicos para el lupus eritematoso sistémico activo (LES) y se correlacionan estrechamente con el inicio de la nefritis del lupus. El autoanticuerpo Jo-1 es uno de una familia de autoanticuerpos característicos observados en los pacientes con miositis [10]. Los científicos también los encuentran específicamente en pacientes con miositis, y los asocian con una alta incidencia de enfermedad pulmonar intersticial concomitante [10]. Los médicos consideran que los anticuerpos dirigidos contra el marcador Sm son un criterio diagnóstico para el LES debido a su alta especificidad por los pacientes con LES [1, 3]. La sola presencia de un nivel elevado de anticuerpos anti-RNP se considera diagnóstico de enfermedad mixta del tejido conectivo (MTEC) y generalmente se asocia con una enfermedad de curso más benigno [3], mientras que se pueden observar niveles bajos de anticuerpos anti-RNP, conjuntamente con otros autoanticuerpos, en el suero de pacientes con esclerosis sistémica progresiva, Síndrome de Sjögren, y artritis reumatoide. La presencia de anticuerpos anti-RNP en el suero de pacientes con LES generalmente se asocia con una incidencia menor de daño renal y una enfermedad de curso más benigno. Por el contrario, los pacientes con anticuerpos anti-Sm experimentan una frecuencia más elevada de complicaciones renales y del sistema nervioso central [6]. Se han llevado a cabo estudios en los que se han observado autoanticuerpos dirigidos contra SSA y SSB en pacientes con LES [5, 4], y enfermedad de Sjögren [7, 9]. Los anticuerpos anti-SSA frecuentemente están presentes en el suero de pacientes con LES que son negativos para AAN, tales como los que padecen lupus eritematoso cutáneo subagudo [12], un síndrome parecido al lupus asociado con una deficiencia homocigota de CI [13], y en un subgrupo de pacientes que carecen de anticuerpos anti-ADNdf [14]. Los anticuerpos anti-Scl-70 son altamente específicos para la esclerodermia [11]. Las investigaciones también muestran estos anticuerpos en una minoría de los pacientes con LES. Los pacientes con esclerodermia, positivos para Scl-70 tienden a tener una enfermedad de curso más severa, más complicaciones de órganos internos y complicaciones considerablemente más difusas que limitadas al área de la piel [14]. Los científicos raramente encuentran anticuerpos anti-Scl-70 en otras enfermedades autoinmunes, y por lo tanto, su detección en un paciente con inicio reciente de fenómeno de Raynaud, es altamente significativa [15]. La Tabla 1 resume los diferentes autoanticuerpos mencionados anteriormente, relacionados con la enfermedad a la cual se asocian [16]:

Anticuerpo	Estado de la enfermedad	% de frecuencia relativa de detección de anticuerpo
Anti-Jo-1	Miositis	25 - 44 [10]
Anti-Sm	LES	30*
Anti-RNP	MTEC, LES	100** y >40, respectivamente
Anti-SSA (Ro)	LES, Sjögren	15 y 35-60, respectivamente
Anti-SSB (La)	LES, Sjögren	15 y 60 - 70, respectivamente
Anti-Scl-70	Esclerodermia sistémica	30 - 34*
Anti-dsDNA	LES	40 - 60*

* altamente específico.
** altamente específico cuando se presenta solo y con título alto.

Hasta hace poco tiempo, el análisis de los autoanticuerpos se realizaba mediante inmunofluorescencia indirecta, difusión en gel de Ouchterlony, hemaglutinación, radioinmunoensayo, o ensayo inmunoadsorbente ligado a la enzima (ELISA). A diferencia de varios otros sistemas, la metodología de ELISA ofrece una evaluación sensible, objetiva y rápida de especímenes, y por lo tanto es adecuada para el rutinario de AAN totales en un número grande de muestras.

Se desconoce la etiología exacta de las enfermedades autoinmunes, y no está claro el papel específico que desempeñan los autoanticuerpos en el inicio de varias enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. El sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS ofrece un procedimiento de prueba eficiente para la evaluación en el laboratorio de pacientes con sospecha de diversas enfermedades del tejido conectivo mediante la asociación y frecuencia de detección de estos anticuerpos.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos del tipo IgG frente a AAN Screen en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos recubiertos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existen en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del ensayo. **NOTA:** los siguientes componentes contienen como conservante ácido de sodio a una concentración de $0,1\%$ (p/v): controles, calibrador y diluyente para muestras.

PARTE	
CONT	1. Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 8x8 micropocillos recubiertos con el antígeno desactivado. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2. Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Hc) de cabra conjugada con peroxidasa de ribano. Un vial de 25 ml con tapón téxico. Lista para usar.
CONTROL +	3. Control positivo (suero humano): un vial de 0,25 ml con tapón rojo.
CAL	4. Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5. Control negativo (suero humano): un vial de 0,25 ml con tapón verde.

DIL	SPH	1. Diluyente de la muestra: un frasco de 10 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Solución de color verde. Lista para usar.
SOLO	TMB	2. TMB: un frasco de 1.5 ml de color índigo con tapón índigo que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Lista para usar.
SOLO	STOP	3. Solución para detener la reacción: un frasco de 25 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ , 1 M y HCl 0,1 M. Lista para usar.
WASHBUF	10X	4. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada, un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 a 8,2.

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZIUUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deséchelos de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlalas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el virus y para anticuerpos contra el VIH y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OMS sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (20).
5. Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p.ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente para muestras, los controles, y el Calibrador contienen ácido sulfúrico en una concentración de $0,1N$ (p/v). Se ha descrito la formación de sales de plomo o cobre a partir de la acidez de estas tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavado con agua después de eliminar las soluciones que contengan ácido de sodio.
8. La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
9. La solución de TMB es IRRITANTE para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (OD).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
15. Nunca pipeteo con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
22. Recoja la solución de lavado en un frasco de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (p.ej. decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice ácido de sodio como conservante. Los residuos de ácido de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/650 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (p.ej. decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micro pocillos: revestidas: vuelta a utilizar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del evaseo del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente para muestras y solución absorbente sin abrir
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECÓGIDA DE LAS MUESTRAS

- 2iUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLIA): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (17, 18). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (21).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine el número de micro pocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa sellable con desecante, sellada y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente para muestra(s) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente).
- A cada micro pocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente para muestra al micro pocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micro pocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 60 y 65 minutos.
- Lave las tirillas de micro pocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micro pocillos.
 - Llene cada micro pocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micro pocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micro pocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y déle unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micro pocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y ténela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micro pocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micro pocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micro pocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micro pocillo, incluido el micro pocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 30 y 35 minutos.
- Lave los micro pocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
- Agregue 100 µl de TMB a cada micro pocillo, incluido el micro pocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 30 y 35 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micro pocillo, incluido el micro pocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
- Ajuste la longitud de onda del lector de micro pocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micro pocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ADECUADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micro pocillo - 100 µl/micro pocillo.
3. \longrightarrow Incube durante 60 - 65 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micro pocillo.
6. \longrightarrow Incube durante 30 - 35 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micro pocillo.
9. \longrightarrow Incube durante 30 - 35 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micro pocillo - Mezcle.
11. Lea en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micro pocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	Intervalo de DO
Control negativo	$\leq 0,250$
Calibrador	$\pm 0,300$
Control positivo	$\geq 0,500$

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser $\leq 0,9$.
 - b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser $\geq 1,25$.
 - c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
 5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
 6. Consulte el documento C24 del ISO: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Cálculos**
 - a. Factor de corrección: El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
 - b. Límite de referencia de la DO: Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)
 - c. Valores índice/cociente de DO: Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo:	DO media del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Límite de referencia de la DO	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	$0,432/0,198 = 2,18$

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	Valor índice/cociente de DO
Muestras negativas	$\leq 0,90$
Muestras dudosas	0,91 - 1,09
Muestras positivas	$\geq 1,10$

- a. Un cociente de DO $\leq 0,90$ indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos de tipo IgG contra AAN.
- b. Un cociente de DO $\geq 1,10$ indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra AAN.
- c. Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS es una ayuda diagnóstica. Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnósticos.
2. Se pueden encontrar resultados positivos de AAN en personas aparentemente sanas. Por lo tanto, es imperativo que los resultados sean interpretados por una autoridad médica que tenga en cuenta la situación clínica del paciente.
3. Los pacientes con LES que están recibiendo tratamiento con esteroideos pueden tener resultados de prueba negativos.
4. Muchos fármacos comúnmente recetados pueden inducir AAN.
5. El sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS no identificará el tipo específico de AAN que está presente en una muestra positiva. Las muestras positivas deben ser analizadas para detectar autoanticuerpos individuales mediante pruebas de reflejo más específicas, tales como el sistema de pruebas ELISA DNA Profile-6 de ZEUS, en combinación con el sistema de pruebas ELISA dsDNA de ZEUS. Alternativamente, los autoanticuerpos específicos se pueden detectar usando una variedad de métodos, tales como la inmunodifusión, la transferencia Western o ensayos multiplexados con perlas fluorescentes, tales como el sistema de pruebas Athena Multi-Lyte® ANA II Plus de ZEUS.

RESULTADOS ESPERADOS

El valor esperado para un paciente normal es un resultado negativo. El número de reactivos y el grado de reactividad dependen de parámetros tales como la población que está siendo estudiada, el tratamiento, etc. Cada laboratorio debe establecer sus propios valores esperados basados en las muestras que analiza típicamente. Con respecto a la enfermedad y porcentaje de reactividad, la Tabla 1 en la sección Importancia y aspectos generales de este prospecto muestra la frecuencia relativa de la actividad de autoanticuerpo para varios trastornos reumáticos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

En una investigación clínica, se analizaron 270 muestras de suero empleando el sistema de pruebas ELISA AMA Screen de ZEUS y un sistema de pruebas ELISA comercial. Se evaluó la especificidad utilizando 72 muestras de personas normales, asintomáticas del sudeste de los Estados Unidos, y la sensibilidad se evaluó utilizando 198 muestras de suero de personas enfermas del noreste de los Estados Unidos. Los resultados del estudio se resumen en las Tablas 1 a 4 siguientes.

Tabla 1: Evaluación del comportamiento de la especificidad

		ELISA AMA Screen de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso	Total
Kit ELISA comercial	Positivo	0	1	1	2
	Negativo	0	59	8	67
	Dudoso	0	1	2	3
	Total	0	61	11	72

Tabla 2: Evaluación del comportamiento de la sensibilidad

		ELISA AMA Screen de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso	Total
Kit ELISA comercial	Positivo	141	7*	8	156
	Negativo	96*	2	2	100
	Dudoso	18	2	2	22
	Total	255	11	12	278

* Representa muestras discrepantes. Consulte la Tabla 4 para conocer los cálculos de sensibilidad relativa

Tabla 3: Resumen de las muestras discrepantes

Número de muestra	Resultado de ELISA		Resultados de IFA Hep-2*
	ELISA ZEUS	Otros ELISA	
62	0,803/dudoso	0,87/negativo	Negativo
64	0,806/dudoso	0,66/negativo	Negativo
65	0,840/dudoso	0,74/negativo	Negativo
66	0,890/dudoso	0,52/negativo	Negativo
68	1,001/dudoso	0,82/negativo	Negativo
69	1,006/dudoso	0,74/negativo	Negativo
70	1,040/dudoso	0,42/negativo	Negativo
71	1,086/dudoso	0,46/negativo	Negativo
73	0,472/negativo	4,88/positivo	≥ 1:80, puntado
74	0,482/negativo	4,88/positivo	≥ 1:80, puntado
76	0,585/negativo	5,47/positivo	≥ 1:80, puntado
77	0,624/negativo	6,64/positivo	≥ 1:80, puntado
79	0,714/negativo	2,14/positivo	Negativo
81	0,798/negativo	2,67/positivo	≥ 1:80, centrómero
83	0,876/negativo	2,68/positivo	≥ 1:80, centrómero
84	0,879/dudoso	4,15/positivo	≥ 1:80, puntado
85	0,884/dudoso	5,65/positivo	≥ 1:80, puntado
87	0,893/dudoso	5,25/positivo	≥ 1:80, centrómero
91	1,021/dudoso	2,79/positivo	≥ 1:320, centrómero
92	1,051/dudoso	2,20/positivo	≥ 1:80, puntado
93	1,065/dudoso	2,74/positivo	≥ 1:320, centrómero
94	1,071/dudoso	5,08/positivo	≥ 1:80, puntado
95	1,091/dudoso	2,22/positivo	≥ 1:80, puntado

* Sistema de pruebas IFA Hep-2 de ZEUS

Tabla 4: Cálculos de la especificidad y la sensibilidad relativa

Especificidad relativa:	
1. Cálculo incluyendo las muestras dudosas: $59/67 = 88\%$	2. Cálculo excluyendo las muestras dudosas: $60/69 = 100\%$
Sensibilidad relativa:	
1. Cálculo incluyendo las muestras dudosas; con resolución de las muestras discrepantes: $141/156 = 90,4\%$	2. Cálculo excluyendo las muestras dudosas; tras la resolución de las muestras discrepantes: $141/147 = 95,9\%$
Porcentaje de concordancia: $200/207 = 96,6\%$	

1. Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento número GP1-T2: *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Services - Second Edition (Evaluación del Comportamiento de la Precisión de Instrumentos de Química Clínica - Segunda Edición)*, publicado por el Comité Nacional para los Estándares del Laboratorio de Química Clínica (NCCLS, por sus siglas en inglés). Se analizaron ocho muestras; dos muestras positivas fuertes, dos muestras moderadamente positivas, dos muestras próximas al valor de corte y dos muestras negativas. Cada muestra fue analizada por duplicado, dos veces por día (mañana y tarde), en cada día. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de la prueba de reproducibilidad

ID	Codiente medio	Sev ^a	St ^a	Días de prueba	% CV	Observaciones totales
1	0,86	0,83	1,28	19	13,95	76
2	11,32	1,29	1,61	20	14,60	80
3	4,20	0,43	0,53	18	12,60	72
4	3,77	0,48	0,56	19	14,96	76
5 _a	1,24	0,07	0,14	20	11,29	80
5 _b	0,94	0,07	0,13	20	14,14	80
6	0,40	0,09	0,14	19	9,09	76
7	0,20	0,05	0,07	18	9,09	72

^a Estimación del punto de la desviación estándar de la precisión dentro de un mismo ensayo.
^b Estimación del punto de la desviación estándar de la precisión total.

1. Reactividad cruzada

Para evaluar la posible reactividad cruzada al utilizar el sistema de pruebas ELISA ANA Screen de ZEUS, se analizaron especímenes negativos para ANA por HEp-2 IFA y positivos para anticuerpos de tipo IgG contra varios antígenos tales como EBV-vCA, EBNA, HSV-1, HSV-2, Chf, rubéola y/o toxoplasmosis. Todas las muestras fueron negativas utilizando el ELISA, lo que indica que la posibilidad de reactividad cruzada con tales anticuerpos es mínima.

REFERENCIAS

1. Tan E, Cohen A, Fries L, et al: Special Article: The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271-1277, 1982.
2. Ruzicki M, Kouki F, Migron F, et al: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 74:201-215, 1983.
3. Sharp GC, Irwin WS, Tan EM, Holman H: 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, 1972.
4. Winfield JB, Brunner CB, Kofler DJ: Serological studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Arthritis Rheum.* 31:289-294, 1978.
5. Tan EM, Kunkel HG: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96:664-679, 1966.
6. Maddison P, Magrvaro H, Provost TT, Reichlin M: The clinical significance of autoantibodies to soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* 6:189-193, 1979.
7. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117, 1969.
8. Alexander S, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB: The Ro(SSA) and La(SSB) antibody system and Sjögren's syndrome. *J. Rheum.* 9:219-246, 1982.
9. Allgaugh MA, Tsalikis N, and Tan E: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
10. Marguerie C, Burot CC, Rayson HL, et al: Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Quart. J. Med.* 77:1029-1038, 1993.
11. Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:99-151, 1989.
12. Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam JM: Subacute cutaneous lupus erythematosus: A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch. Derm.* 125:1409-1415, 1979.
13. Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti Ro (SSA) antibodies. *Arth. Rheum.* in Press.
14. Leffroy EC, Black CM, Reichmayer R, et al: Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:200-205, 1988.
15. Weiner ES, Hildebrandt S, Sericea JJ, et al: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 34:68-77, 1991.
16. Moxley AB, Hess EV: Antinuclear antibodies and disease specificity. *Advances in Int. Med.* 36 (1): 151-168, 1989.
17. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H19-A, Vol. 18, No. 12, Approved Guideline, 1990.
18. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
19. Sturgeon A: Review: Recently characterized autoantibodies and their clinical significance. *Aust. N.Z. J. Med.* 22:279-289, 1992.
20. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64180, 1991.
21. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-55238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Duane Way, Broomfield, New Jersey, 08007, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-330-2111, Option 2
 International: +1 908-426-1714
 Fax: +1 908-426-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS Health y Salud Diágnos[®] son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific. Same al número gratuito o envíe un e-mail support@zeuscientific.com.
 Para consultas a distribuidor al cliente y asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

