

Determinación de anticuerpos IgG contra el ADN de doble cadena mediante ELISA utilizando como recubrimiento ADN xenógeno y alógeno

Determination of IgG antibodies to double-chain DNA by ELISA using the xenogenic and allogenic DNA as coat

Gipsis Suárez Román;^I Antonio Mario González Griego;^{II} Tammy Fernández Romero;^I Victoria Esther González Ramírez.^I

^I Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" Ciudad de la Habana, Cuba.

^{II} Departamento de Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica, Ciudad de la Habana, Cuba.

RESUMEN

El ADN xenógeno empleado como recubrimiento de un inmunoensayo enzimático indirecto, para la determinación de anticuerpos IgG contra el ADN de doble cadena, es de difícil obtención y muy costoso. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es evaluar la utilidad del ADN alógeno como antígeno de recubrimiento para detectar estos anticuerpos.

Se empleó como recubrimiento ADN de timo de ternera y ADN de 6 sujetos supuestamente sanos. El análisis de la presencia de los anticuerpos se realizó en suero de 16 individuos con diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico.

Se obtuvo un 100% de coincidencia en los resultados, así como pocas diferencias en la capacidad de discriminación del método con el empleo de los dos tipos de ADN. Según lo anterior se concluye que el ADN humano es útil como recubrimiento de este enzimoimmunoensayo. La obtención de dicho antígeno es menos costosa que la del ADN de timo de ternera.

Palabras clave: enzimoimmunoensayo, anticuerpos IgG contra el ADN de doble cadena, ADN xenógeno, ADN alógeno.

ABSTRACT

Obtaining of the xenogenic DNA used as coat of an indirect enzyme immunoassay, to determine IgG antibodies to double-chain DNA is difficult, and also it is very expensive. Thus, aim of this paper is to evaluate usefulness of allogenic DNA as coat antigen to detect these antibodies. As coat we used DNA from calf thymus, and DNA from 6 subjects supposedly healthy. Analysis of presence of antibodies was carried out in sera from 16 individuals with diagnosis of systemic lupus erythematosus. There was a 100% of coincidence in results, as well as a few differences in discrimination ability of method using the two types of DNA. According above mentioned, we conclude that human DNA is useful as coat of this enzyme immunoassay. Achievement of such antigen is less expensive than that of DNA from calf thymus.

Key words: Enzyme immunoassay, Ig antibodies to double-chain DNA, xenogenic DNA, allogenic DNA

INTRODUCCION

Los anticuerpos contra el ADN de doble cadena (anti-ADNdc) fueron descubiertos en 1957. La presencia de estos anticuerpos constituye uno de los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Reumatología para el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) ^{1, 2, 3}.

Numerosas pruebas para la determinación de anti-ADNdc han sido ideadas. Entre ellas se encuentran el Radioinmunoanálisis (RIA), la inmunofluorescencia Indirecta con *Crithidia luciliae* (CLIF), el ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), el ELiA (*Fluorescence Enzyme Linked Immunoassay*) y la Citometría de Flujo ^{1, 2, 3}.

La detección de anti-ADNdc mediante ELISA está ampliamente difundida en los laboratorios clínicos por las ventajas que esta técnica posee: la relativa sencillez, la rapidez de ejecución, el bajo costo del equipamiento, la posibilidad de automatización y el procesamiento de gran número de muestras a la vez. Además emplea pequeñas cantidades de muestras y reactivos y presenta elevada precisión, sensibilidad, especificidad y detectabilidad. ^{4, 5, 6}.

Existen juegos diagnósticos comerciales disponibles que utilizan como recubrimiento ADN plasmídico, ADN bacteriano, ADN de timo de ternera y ADN humano recombinante, los cuales son muy costosos. A esto se adiciona que estos antígenos son difíciles de obtener ^{1, 7, 8, 9}.

Para que el diagnóstico del LES se haga en condiciones que se acerquen más al concepto de autoinmunidad y lograr una mayor especificidad, así como disponer de un antígeno obtenido en nuestros propios laboratorios por un método fácil, sencillo y menos costoso, este trabajo tiene el objetivo de evaluar la utilidad del ADN genómico humano (alógeno) como recubrimiento del ensayo de inmunoenzima para la determinación de IgG anti-ADNdc.

MÉTODOS

Muestras

Se recogió suero de 16 pacientes con diagnóstico de LES, según criterios de la Asociación Americana de Reumatología modificados en 1982 y revisados en 1997. Se obtuvo sangre total fresca de 6 individuos supuestamente sanos destinados a la obtención del antígeno. Se empleó suero de personas supuestamente sanas como control negativo en los ensayos, procedente del banco de sangre ubicado en el municipio Marianao. Se utilizó suero de individuos enfermos con más de 100 DS (desviaciones estándar) o unidades de positividad como control positivo.

Obtención del antígeno

Extracción de ADN genómico humano. Diez mL de sangre fresca se mezclan con 250 μ L de EDTA (56mg/mL) como anticoagulante en tubo corning de 50mL. Se añade solución reguladora fosfato salino (PBS1x) hasta completar los 50 mL, se homogeniza suavemente y se centrifuga a 4000rpm durante 15 minutos a 4°C, luego de lo cual se desecha el sobrenadante. Se resuspende el pellet con solución de lisis celular (TLB) y se coloca durante 30 minutos a 4°C. Se centrifuga a 4000rpm durante 15 minutos y se desecha el sobrenadante. Se le añade al pellet 3 mL de solución de lisis nuclear (NLB), 230 μ L de SDS al 10% y 60 μ L de proteinasa K y se incuba 1 hora a 55°C y luego a 37°C durante toda la noche. Se le añade 1 ml de NaCl 6M y 5 mL de cloroformo- alcohol isoamilico, se precipita el ADN con 2-propanol y se lava con etanol al 70%. El pellet se disuelve en Tris EDTA.

La concentración del ADN extraído fue medida espectrofotométricamente a 260 nm y la pureza fue confirmada mediante la razón A_{260}/A_{280} .

Determinación de IgG anti-ADNdc mediante ELISA indirecto

Se utilizó como antígeno ADN genómico de 6 personas supuestamente sanas (alógeno) y ADN de timo de ternera (xenógeno), obtenido comercialmente (Merck). Las condiciones empleadas con ambos tipos de antígenos fueron las siguientes: las placas de microtitulación de polivinil cloruro (PVC) fueron irradiadas con luz ultravioleta durante 16 horas. Luego fueron cubiertas con ADN xenógeno y tres ADN alógenos disueltos en PBS1x, pH 7.2 a concentración de 10 μ g/mL. Después de incubación en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche, las placas fueron lavadas con PBS 1x. Las muestras y los controles diluidos en PBS-Tween +BSA al 2% fueron añadidos a una dilución 1:100 e incubados en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora. Se realizó lavado con PBS-Tween al 0.05% y se añadió IgG anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante diluido 1:4000 en PBS-Tween +BSA al 2%. Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora, se efectuó lavado con PBS-Tween al 0.05% y se añadió sustrato (o-fenilendiamina, Merck). Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos, deteniéndose la reacción con H_2SO_4 3M. Los valores de absorbancia fueron medidos a 492 nm mediante lector de micro ELISA (Organon-technika).

En cada placa se corrió un control negativo, un control positivo y cuatro muestras. Cada placa se consideró un ensayo. Se efectuaron un total de cuatro ensayos (1 al 4). En el primer ensayo se utilizaron tres ADN alógenos diferentes a los empleados en el segundo, tercero y cuarto.

Estudios de precisión: repetibilidad intraensayo e interensayos

Se montaron 4 réplicas de las muestras y de los controles positivo y negativo para evaluar repetibilidad intraensayo. Cada ensayo se repitió dos veces, en días

diferentes, pero manteniendo las mismas condiciones para evaluar la reproducibilidad de los mismos.

Análisis de los resultados

Los coeficientes de variación (CV) se determinaron según los métodos estándares. Se calculó la capacidad de discriminación (K) para cada antígeno. Esta es una variable cuantitativa continua, la cual se refiere a la capacidad de diferenciar entre los valores positivos y los negativos. A mayor valor de K mejor es el poder discriminatorio. Es adimensional.

$$K = X_{C+} / X_{C-}$$

X_{C+} Densidad óptica media del control positivo.

X_{C-} Densidad óptica media del control negativo.

La cuantificación de anticuerpos IgG anti-ADNdc (CA) se determinó mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$CA = X_m - X_{c-} / DS_{c-}$$

X_m Densidad óptica media de la muestra.

X_{c-} Densidad óptica media del control negativo.

DS_{c-} Desviación estándar del control negativo.

La CA es una variable cuantitativa continua que se expresa en desviaciones estándar (unidades de positividad). Informa la cantidad de veces que está contenida la desviación estándar del control negativo en la muestra. La desviación estándar usualmente es empleada para establecer un valor de corte que permite emitir un criterio cualitativo, o sea, la presencia o no de una sustancia o metabolito en un determinado fluido biológico. Nuestro laboratorio emplea la desviación estándar para dar un criterio cuantitativo, lo cual desde el punto de vista médico tiene gran importancia. Esto posibilita la individualización de la terapéutica de los pacientes lúpicos.

Los criterios con los que se trabajó para un 99.9% de confianza fueron los siguientes: se tomó como valor negativo de referencia cuando $CA < 3 DS$ (unidades de positividad). Se consideró ideal si $Ke < 10$, aceptable si $5 < K < 10$ y desfavorable si $K < 5$. La obtención de un $CV_K < 10\%$ indicaría la no existencia de diferencias notables en los resultados, un $10\% < CV_K < 20\%$ significaría la existencia de diferencias poco notables en los resultados y si $CV_K > 20\%$ implicaría la existencia de diferencias notables. Se tomó un CV intraensayo e interensayo como ideal si $CV < 10\%$, aceptable si $10\% < CV < 20\%$ y desfavorable si $CV > 20\%$.

RESULTADOS

El grado de pureza de los dos tipos de ADN empleados en el estudio se encontró dentro del rango aceptado como ideal (1.6-2.0). Esto indica que el ADN no estaba contaminado con proteínas ([Tabla 1](#)).

Un total de 16 muestras séricas de individuos con diagnóstico de LES fueron analizadas. Hubo un 100% de concordancia en cuanto a los resultados obtenidos

con los diferentes antígenos empleados. En las tablas 2 y 3 se puede observar que 15 de las 16 muestras fueron positivas y sólo una negativa con el empleo del ADN xenógeno y de los diferentes ADN alógenos.

En el primer ensayo las capacidades de discriminación (K) del método con el uso de ADN xenógeno y con los ADN alógenos 1, 2 y 3 resultaron aceptables (8.1, 9.3, 8.8 y 7.0 respectivamente). Las K obtenidas en los ensayos 2 y 3 fueron las siguientes: 5.7, 4.9, 5.2 y 4.5; 6.4, 5.0, 5.4 y 4.4 respectivamente. Con el empleo del ADN alógeno 6 en los ensayos 2 y 3 el método mostró una capacidad de discriminación desfavorable, al igual que con el alógeno 4 en el ensayo 2. En el ensayo 4 se obtuvieron valores de K aceptables tanto con el ADN xenógeno como con los ADN alógenos 4, 5 y 6 (6.9, 5.5, 5.5 y 5.3) (Figura 1).

En los ensayos 2, 3 y 4 la K con el ADN xenógeno fue superior a la obtenida con los ADN alógenos, ocurriendo lo contrario con dos de los alógenos en el primer ensayo realizado (Figura 1).

El coeficiente de variación entre las capacidades de discriminación (CV_K) con el empleo de cada antígeno se mantuvo por debajo del 10% en el ensayo 2. En los ensayos 1, 3 y 4 el CV_K tomó valores entre el 10% y el 20% (Figura 1).

La mayoría de los coeficientes de variación de los controles negativos y de las muestras estuvieron por debajo del 10% y una minoría está comprendida en el rango aceptable. Cuando se evaluó la reproducibilidad algunas muestras (M_2 con el ADN xenógeno, M_3 con el ADN alógeno 2, M_4 con el ADN alógeno 4 y M_7 con el ADN alógeno 6) alcanzaron coeficientes de variación desfavorables (Tablas 4 y 5).

DISCUSION

La línea que se ha trazado Cuba, como país en vías de desarrollo, es la de producir, en la medida de las posibilidades, los productos biológicos que se requieren en las técnicas analíticas. Este principio es el que llevó a evaluar la utilidad del empleo del ADN genómico humano (alógeno) como recubrimiento del ELISA para detectar anticuerpos anti-ADNdc en el diagnóstico del LES.

En este estudio sólo se determinaron anticuerpos anti-ADNdc de tipo IgG ya que son más específicos para el LES que los de tipo IgM.^{3, 8}

Se obtuvo un 100% de coincidencia en los resultados con el uso de los dos tipos de ADN, lo cual indica que cualquiera de ellos puede emplearse como recubrimiento en el método ELISA. En la literatura se reporta que los anticuerpos anti-ADNdc reaccionan contra epítopes conformacionales del eje pentosa-fosfato que es común a todos los ADN.³ Hay autores que plantean que los anti-ADNdc reaccionan específicamente contra secuencias teloméricas del ADN, las cuales son características de cada especie. A pesar de esto las secuencias teloméricas en mamíferos superiores no muestran muchas diferencias.¹⁰

La otra variable que se tuvo en cuenta en este estudio fue la capacidad de discriminación del método. En su mayoría, las K obtenidas con cada tipo de antígeno en los 6 ensayos llevados a cabo fueron aceptables. En esto influye si se utilizan sustancias antes del recubrimiento, si los reactivos están en buen estado, la pureza del antígeno y su grado de polimerización, si el antígeno es modificado, la calidad de las soluciones empleadas, etc.^{1, 6, 11, 12, 13}

En el ELISA llevado a cabo no se emplea ninguna sustancia pre-recubrimiento como sulfato de protamina, polihistidina o polilisina, que pueden conllevar a la aparición de falsos positivos.^{1, 11, 12} Además, el ADN se utiliza en su forma intacta, o sea, no es fragmentado. Cuando el antígeno es fragmentado se pueden producir reacciones no específicas con dichos fragmentos que conducen a resultados falsos positivos.^{12, 13}

Las soluciones reguladoras o amortiguadoras usadas fueron preparadas y almacenadas cuidadosamente para evitar su contaminación bacteriana, ya que las que contienen fosfato y Tris constituyen un medio excelente para saprófitos, bacterias, etc. No se adicionaron a las soluciones amortiguadoras ningún agente antimicrobiano como azida o mercurio pues los mismos tienen un efecto devastador sobre la actividad enzimática en sistemas, que como este, usan peroxidasa.^{1, 12}

Tanto el ADN xenógeno como el ADN genómico alógeno poseían grados de pureza adecuados. A mayor grado de pureza mayor cantidad de ADN se adhiere al pocillo, el riesgo de interferencias disminuye y se produce una mejor señal. Ello contribuye a lograr una buena capacidad de discriminación del método. Precisamente, la utilización de un antígeno altamente purificado constituye uno de los requisitos a tener en cuenta a la hora de realizar un enzoinmunoensayo.^{1, 4, 6}

El ADN de timo de ternera presentó un grado de pureza (1.86) mayor al de los ADN alógenos 4, 5, 6 (1.75, 1.65 y 1.71 respectivamente). Basado en lo expuesto en el párrafo anterior se explica que en los ensayos 2, 3 y 4 la K del método con el empleo del ADN xenógeno fuera mayor a la K con cada ADN alógeno utilizado. Aunque el ADN xenógeno y los ADN alógenos 1, 2 y 3 utilizados en el ensayo 1 poseían grados de pureza similares, se observa como la K obtenida usando el ADN alógeno 1 y 2 fue superior a la K mostrada con el ADN xenógeno ([Tabla 1](#)) ([Figura 1](#)).

El grado de polimerización del antígeno influye notablemente sobre la K. A mayor grado de polimerización se incrementa la posibilidad de que no se pierdan los epítopes conformacionales contra los que se supone reaccionan los anti-ADNdc.^{1, 4, 6} Se conoce que el ADN de timo de ternera posee un elevado grado de polimerización (según Directorio Linscott de reactivos inmunológicos y biológicos), el cual no fue determinado en los ADN alógenos usados.

A pesar de estas diferencias los coeficientes de variación entre la capacidad de discriminación del método con los antígenos empleados en cada ensayo demostraron que estas no son importantes. Ello se explica por lo expuesto anteriormente al hacer referencia al grado de coincidencia en los resultados.

El costo estimado de una extracción de ADN genómico humano por el método empleado es aproximadamente 3 USD. Este cálculo está basado en el costo de los reactivos, el tiempo de funcionamiento de los equipos, el tiempo empleado por los técnicos para la realización de la técnica, etc. No se incluyen la cristalería, ni el costo de los equipos.

Teniendo en cuenta que el volumen mínimo que se puede obtener en una extracción de ADN genómico humano es de 150µL, se estima que el costo de 1mL sería de 20 USD. Si el costo de 1mL de ADN de timo de ternera es de 200 USD, se ahorrarían 180 USD.

De manera general se logró una buena precisión de los resultados. Algunas muestras presentaron coeficientes de variación desfavorables, atribuible a posible contaminación de las mismas.

Se concluye que el ADN alógeno es un antígeno tan útil como el ADN xenógeno para la detección de anticuerpos IgG anti-ADNdc mediante ELISA. El ADN alógeno puede ser obtenido en nuestros laboratorios por un método sencillo y menos costoso que los antígenos comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rose N R, Hamilton R G, Detrick B. Editores. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington: Editorial ASM Press; 2002.
2. Oldchowka N. Methods for detection of anti-dsDNA autoantibodies. *Elias Journal* 2002; 1: 7-8.
3. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J of Med* 1998; 338(19): 1359-1368.
4. Ochoa F. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. La Habana: Finlay Ediciones; 2004.
5. Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5a ed. Madrid: Harcourt; 2001.
6. Reina M. ELISA. [en línea] 2003 [fecha de acceso Enero de 2005]. URL disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>
7. Gonzalez C, Guevara P, Garcia-Berrocal B, Navajo J, Gonzalez-Buitrago J. Clinical evaluation of cobas core anti-dsDNA EIA quant. *J Clin Lab Anal* 2004; 18(3): 200-205.
8. Janyapoon K, Jivakanont P, Surbrsing R, Siriprapapan W, Tachawuttiwat T, Korbsrisate S. Detection of anti-dsDNA by ELISA using different sources of antigen. *Pathology* 2005 Feb; 37(1):63-68.
9. Wigand R, Gottschalk R, Falkenbach A, Matthias T, Kaltwasser JP, Hoelzer D. Detection of dsDNA antibodies in diagnosis of systemic lupus erythematosus comparative studies of diagnostic effectiveness of 3 ELISA methods with different antigens and a Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Z Rheumatol* 1997; 56 (2): 53-62.
10. Wallace DJ, Salonen EM, Avannis-Aghajani E, Morris R, Metzger AL, Pashinian N. Anti-telomere antibodies in systemic lupus erythematosus: a new ELISA test for anti-DNA with potential pathogenetic implications. *Lupus* 2000; 9(5):328-332.
11. Kroubouzos G, Tosca A, Konstadoulakis M, Varelzidis A. Poly-L-lysine causes false results in ELISA methods detecting anti-dsDNA antibodies. *J Immunol Methods* 1992; 148: 261-263.
12. Janyapoon K, Siriprapapun W, Techawuttiwat T, Jivaganon P. Evaluation of optimal conditions for dsDNA coating on microtiter plates for anti-dsDNA detection by ELISA. *Bull Health Sci Tech* 2003; 6: 31-38.

13. Pitsetsky D, González T. The influence of DNA size on the binding of antibodies to DNA in the sera of normal human subjects and patient with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 1999; 116: 334-339.

Recibido: Diciembre 2007

Aprobado: Febrero 2008

Gipsis Suárez Román; Doctora en Medicina. Especialista de 1^{er} Grado en Bioquímica clínica. Instructor. Email: gipsis@giron.sld.cu

Antonio Mario González Griego; Dr. En Medicina. Dr.CM. Especialista de 2^{do} Grado en Inmunología. Profesor Académico y Titular. Departamento de Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica.

Tammy Fernández Romero; Dra. En Medicina. Especialista de 1^{er} grado en Bioquímica Clínica. Instructor. Departamento de Bioquímica. ICBP "Victoria de Girón".

Victoria Esther González Ramírez; Dra. En Medicina. Especialista de 2^{do} Grado en Inmunología. Profesor Auxiliar. Departamento de Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica.

Tabla 1: Concentración y grado de pureza de cada ADN empleado como recubrimiento del ELISA para determinar IgG anti-ADNdc.

Antígeno (ADN)	Concentración (µg/mL)	Pureza A_{260}/A_{280}
Xenógeno	830	1.86
Alógeno 1	1915	1.85
Alógeno 2	1445	1.85
Alógeno 3	2795	1.86
Alógeno 4	4695	1.75
Alógeno 5	2020	1.65
Alógeno 6	3990	1.71

Tabla 2: Resultados de la determinación de IgG anti-ADNdc mediante ELISA utilizando ADN xenógeno y ADN alógenos 1, 2 y 3 como antígenos.

CA: cuantificación de anticuerpos. M_n : muestras. Valor de referencia negativo: $\leq 3DS$.

Antígeno	M_1	M_2	M_3	M_4
Xenógeno	38.22	5.01	8.67	42.30
Alógeno 1	58.45	6.03	10.31	60.75
Alógeno 2	62.86	11.45	12.27	73.28
Alógeno 3	92.67	9.09	15.96	89.35

CA (DS o unidades de positividad)

Tabla 3: Resultados de la determinación de IgG anti-ADNdc mediante ELISA utilizando ADN xenógeno y ADN alógenos 4, 5 y 6 como antígenos.

CA: cuantificación de anticuerpos. M_n : muestras. Valor de referencia negativo: $\leq 3DS$.

Muestras	xenógeno	alógeno 4	alógeno 5	alógeno 6
M5	50.00	38.00	39.00	46.00
M6	5.10	10.00	3.90	5.50
M7	77.00	36.00	47.00	41.00
M8	78.00	48.00	48.00	54.00
M9	1.50	-0.30	-0.10	-2.90
M10	11.00	17.00	35.00	25.00
M11	9.00	8.60	13.00	8.80
M12	12.00	17.00	16.00	11.00
M13	8.00	8.40	10.00	10.00
M14	8.00	12.00	12.00	12.00
M15	35.00	49.00	54.00	58.00
M16	7.90	7.30	3.70	11.00

CA (DS o unidades de positividad)

Figura 1. Capacidad de discriminación (K) según antígeno

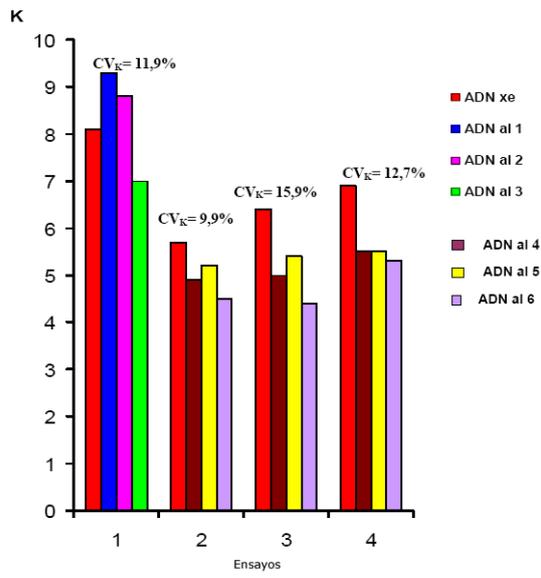


Figura 1. Capacidad de discriminación (K) según antígeno

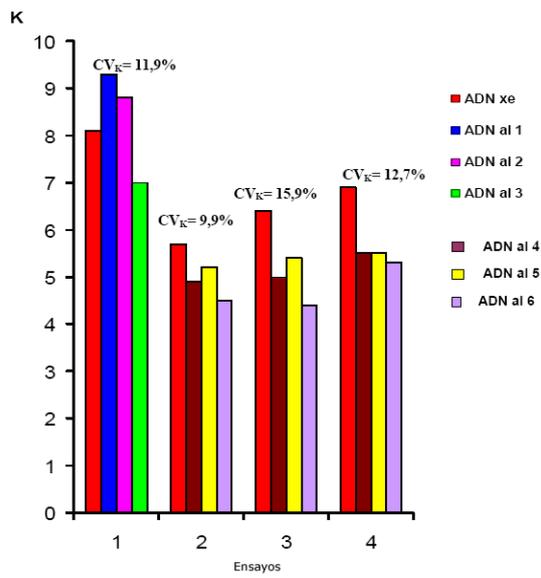


Tabla 4: Repetibilidad intra ensayo para la determinación de IgG anti-ADNdc utilizando ADN xenógeno y alógeno (n=4).

X_c- media del control negativo. DS_c- desviación estándar del control negativo. CV coeficiente de variación. M_n muestras. n número de réplicas.

Antígeno	Repetibilidad intra ensayo (n=4)						
	X _c	DS _c	CV (%)				
			C ⁻	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Xenógeno	0.291	0.023	7.9	9.8	3.6	4.7	0.5
Alógeno 1	0.256	0.029	11.3	6.9	11.6	5.9	0.4
Alógeno 2	0.264	0.029	10.9	4.6	8.9	4.1	1.2
Alógeno 3	0.338	0.027	7.9	4.7	6.5	7.5	2.7
			C ⁻	M ₅	M ₇	M ₈	M ₁₅
Xenógeno	0.429	0.026	6.1	7.0	0.9	0.4	10.8
Alógeno 4	0.365	0.036	9.9	5.6	6.3	3.2	5.9
Alógeno 5	0.442	0.039	8.8	5.2	2.6	1.7	3.6
Alógeno 6	0.449	0.031	6.9	2.5	6.7	1.4	4.5

Tabla 5: Repetibilidad Inter ensayo para la determinación de IgG anti-ADNdc utilizando ADN xenógeno y alógeno.

X_c- media del control negativo. DS_c- desviación estándar del control negativo. CV coeficiente de variación. M_n muestras. n número de réplicas.

Antígeno	Repetibilidad intra ensayo (n=2)						
	X _c	DS _c	CV (%)				
			C ⁻	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Xenógeno	0.308	0.024	7.8	1.3	20.6	2.1	3.2
Alógeno 1	0.270	0.020	7.4	12.1	17.4	16.8	3.9
Alógeno 2	0.281	0.024	8.5	14.9	6.1	28.2	13.1
Alógeno 3	0.340	0.003	0.9	14.2	2.4	6.5	17.5
			C ⁻	M ₅	M ₇	M ₈	M ₁₅
Xenógeno	0.435	0.009	2.1	4.1	1.1	0.6	9.0
Alógeno 4	0.421	0.079	18.8	20.9	16.9	1.1	0.4
Alógeno 5	0.434	0.011	2.5	8.0	1.7	0.3	4.9
Alógeno 6	0.439	0.013	2.9	17.4	21.1	6.5	1.8