




	ZENIT RA β_2-GLYCOPROTEIN I IgG	Distribuido por 
INSTRUCCIONES DE USO	   100	

USO PREVISTO

El ensayo *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa, mediante el instrumento *ZENIT RA Analyser*, de los anticuerpos específicos de clase IgG contra la β_2 -glicoproteína I en muestras de suero o plasma humano (EDTA, heparina).

Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación del síndrome antifosfolípidos (APS).

ATENCIÓN: una decisión médica, sea cual fuere, no puede basarse únicamente en el resultado de este análisis, sino que debe fundarse en la evaluación del conjunto de datos clínicos y de laboratorio disponibles.

IMPORTANCIA CLÍNICA

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aPL) en pacientes con trombosis venosas o arteriosas, o en pacientes con complicaciones obstétricas, es el marcador de laboratorio esencial (junto con el LAC) para el diagnóstico del "*síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS)*"¹.

Según los criterios de Sapporo, actualizados en 2006¹, el diagnóstico de APS puede definirse en presencia de por lo menos un criterio clínico y uno de laboratorio.

Los criterios de laboratorio consideran la positividad persistente en el tiempo (12 semanas) a un título medio/alto de anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I (a β_2 GPI) o anticuerpos anticoagulante lúpico (LAC).

Los anticuerpos aCL y a- β_2 GPI pueden ser tanto de isotipo G como M y tener un título superior a 40 U/ml.

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos se demostró por primera vez en 1941, en muestras de pacientes con diagnóstico serológico de sífilis². Se comprobó que el suero de estos pacientes interactuaba con el fosfolípido cardiolipina contenido en los estratos de corazón bovino del ensayo VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), considerado específico para el diagnóstico de la sífilis.

La especificidad del análisis VDRL fue puesta en duda por los numerosos resultados de falsa positividad en muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas y en ausencia de enfermedades venéreas. En 1983, Harris et al.³, utilizando un método de elevada sensibilidad para determinar los anticuerpos anticardiolipina, encontraron altas concentraciones de aCL en el 61% de pacientes con LES, demostrando una significativa correlación entre los niveles de anticuerpo y las trombosis venosas y arteriosas, el anticoagulante lúpico y la trombocitopenia.

En 1990, dos grupos independientes de investigadores^{4,5} demostraron que para evidenciar los anticuerpos anticardiolipina es indispensable la presencia de la β_2 -glicoproteína I.

La β_2 -glicoproteína I tiene un peso molecular de 50 kDa aproximadamente, una concentración plasmática de unos 0,15-0,30 mg/ml y una función biológica que todavía es oscura (parece capaz de modular el metabolismo de las lipoproteínas, de interferir en algunas reacciones de coagulación y tener un efecto antiagregante plaquetario⁶⁻⁹). Recientes estudios cristalográficos definieron la estructura tridimensional de la proteína y su organización en 5 dominios¹⁰⁻¹¹, proporcionando útiles informaciones acerca del funcionamiento de esta molécula.

En particular, el dominio V presenta numerosos residuos de lisina, que son responsables de la interacción electrostática de la β_2 -glicoproteína I con los fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares¹². A través del mismo mecanismo, se produce *in vitro* el ligado entre la β_2 -glicoproteína y la cardiolípidina adsorbida a la fase sólida. Se demostró ampliamente que los anticuerpos anticardiolípidina de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos reconocen una porción modificada de la β_2 -glicoproteína I; dichos autoanticuerpos no pueden reconocer la cardiolípidina, la β_2 -glicoproteína nativa no ligada a fases sólidas o a otras estructuras^{4,5,13-15}.

El estado actual de los conocimientos nos permite definir los anticuerpos anticardiolípidina como anticuerpos capaces de ligarse a neoepítomos generados por el ligado entre β_2 -glicoproteína y cardiolípidina adsorbida a una fase sólida.

Sucesivamente, se demostró^{4,16} que los anticuerpos anticardiolípidina en los pacientes con enfermedades autoinmunes pueden reconocer la β_2 -glicoproteína I directamente adsorbida en microplacas de poliestireno, tratado UV o irradiado. También en este caso, el reconocimiento de la molécula por parte de los autoanticuerpos está determinado por las modificaciones estructurales causadas por el ligado de la proteína a la fase sólida.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG para la determinación cuantitativa de las IgG específicas anti- β_2 -glicoproteína I utiliza un método inmunológico indirecto de dos pasos, basado en el principio de la quimioluminiscencia.

La β_2 -glicoproteína I se utiliza para recubrir las partículas magnéticas (fase sólida); un anticuerpo anti-IgG humana se marca con un derivado del éster de acridinio (conjugado).

Durante la primera incubación, los anticuerpos específicos presentes en la muestra, en los calibradores o en los controles se ligan a la fase sólida.

Durante la segunda incubación, el conjugado reacciona con los anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I IgG capturados en la fase sólida.

Después de cada incubación, el material no ligado a la fase sólida se elimina por aspiración y sucesivo lavado.

La cantidad de conjugado marcado que queda ligado a la fase sólida se evalúa activando la reacción de quimioluminiscencia y midiendo la señal luminosa. La señal generada, expresada en unidades relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), indica la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra, calibradores y controles.

AUTOMATIZACIÓN

El instrumento *ZENIT RA Analyser* efectúa automáticamente todas las operaciones previstas en el protocolo de análisis: añadir en el recipiente de reacción las muestras, calibradores, controles, partículas magnéticas, conjugado y soluciones de activación de la quimioluminiscencia; separación magnética y lavado de partículas; medición de la luz emitida.

El sistema calcula los resultados del análisis de muestras y controles mediante curva de calibración memorizada e imprime un informe que incluye todas las informaciones correspondientes al análisis y al paciente.

MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales y reactivos suministrados

REAG	1	MP	2,5 ml
------	---	----	--------

Partículas magnéticas recubiertas de β_2 -glicoproteína I en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras, tensoactivo, Pro-Clin 300 y azida de sodio (< 0,1 %) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 ml
------	---	------	-------

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humana marcado con un derivado del éster de acridinio (conjugado) en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras y azida de sodio (< 0,1 %) como conservante.

REAG	3	DIL	25 ml
------	---	-----	-------

Solución diluyente de muestras: tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	4	CAL A	1,6 ml
------	---	-------	--------

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 ml
------	---	-------	--------

Suero humano con alta concentración de anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

Todos los reactivos están listos para usar.

Los reactivos 1, 2 y 3 están reunidos en un único conjunto que constituye el cartucho de reactivos.

Las concentraciones de los calibradores se expresan en UA/ml (unidades arbitrarias) y están calibradas frente a un estándar de referencia interno. Los valores de las concentraciones, específicos para cada lote de producto, están registrados en el disco de datos incluido en el kit.

DISCO DE DATOS

Mini-DVD con las informaciones relacionadas con todos los productos de la Línea ZENIT RA (reactivos, calibradores, sueros de control), actualizados hasta el último lote de producción; están excluidos los productos caducados a la fecha de redacción del nuevo disco de datos.

Es suficiente conservar el disco de datos con el número de lote más alto para mantener actualizadas las informaciones necesarias para el funcionamiento correcto del sistema.

Materiales y reactivos necesarios no incluidos en el kit

- | | |
|---|---------------|
| - ZENIT RA Analyzer | Cód. nº 41400 |
| - ZENIT RA Cuvette Cube *
Paquete de 960 cubetas. | Cód. nº 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid *
1 botella de 0,5 litro de solución 10x. | Cód. nº 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution *
1 botella de 0,5 litro de solución 20x. | Cód. nº 41407 |
| - ZENIT RA Trigger Set *
1 frasco de 250 ml de Trigger A (solución de preactivación)
1 frasco de 250 ml de Trigger B (solución de activación) | Cód. nº 41403 |
| - ZENIT RA D-SORB Solution
Paquete de 2 botellas de 1 litro de solución lista para usar. | Cód. nº 41436 |
| - ZENIT RA Cartridge Checking System * | Cód. nº 41401 |
| - ZENIT RA Top Cap Set
300 tapones superiores para cerrar los envases de calibradores después de usarlos por primera vez. | Cód. nº 41566 |

(*) El instrumento ZENIT RA Analyzer y el material auxiliar marcado con asterisco son fabricados por Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Lieja, Bélgica, y distribuidos por A. Menarini Diagnostics Srl.

Otros reactivos aconsejados

ZENIT RA APS IgG CONTROL SET

Cód. nº 41450

3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos del kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG deben utilizarse exclusivamente para diagnóstico *in vitro*; no deben utilizarse *in vivo* en seres humanos o animales.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales en el pleno respeto de las instrucciones contenidas en el presente documento.

La firma A. Menarini declina toda responsabilidad por daños o perjuicios derivados de un uso que no se atenga a las instrucciones dadas.

Precauciones de seguridad

Este producto contiene material de origen animal y por consiguiente debe ser manipulado como si se tratara de material infeccioso.

Este producto contiene componentes de origen humano. Todo el suero o plasma utilizado ha sido analizado mediante métodos aprobados por la FDA y resultó negativo a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti-HCV, anti-HIV1 y anti-HIV2.

Sin embargo, dado que ningún método de análisis puede garantizar la total ausencia de agentes patógenos, todo el material de origen humano debe considerarse potencialmente infeccioso y manipulado como tal.

Ante un embalaje dañado con derrame de reactivos, descontaminar el área afectada con una solución diluida de hipoclorito de sodio, no si antes ponerse los elementos de protección individual adecuados (delantal, guantes, gafas).

El material utilizado para limpiar, así como los residuos del embalaje en que se produjo el derrame, se eliminará conforme con las normas nacionales para la eliminación de residuos potencialmente infecciosos.

Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo, cobre y latón de las tuberías formando azidas explosivas; por tanto, se recomienda que los reactivos o residuos relacionados no se eliminen por el desagüe, sino que se sigan las normas nacionales en materia de eliminación de residuos potencialmente peligrosos.

Precauciones operativas

Para que los resultados obtenidos sean fiables, es necesario atenerse estrictamente a las instrucciones de uso de este documento, y seguir escrupulosamente las indicaciones del manual operativo del instrumento.

Los reactivos del kit deben utilizarse exclusivamente con el sistema *ZENIT RA Analyzer*.

Los componentes del cartucho de reactivos no pueden quitarse del cartucho ni reensamblarse.

No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos contenidos en el kit están listos para usar.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Conservar los reactivos del kit a 2-8 °C, en posición vertical y a oscuras.

En estas condiciones, el cartucho de reactivos y los calibradores sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad.

Una vez abierto, el cartucho de reactivos puede utilizarse durante 60 días, siempre que se lo conserve en refrigerador a 2-8 °C o bien dentro de la máquina.

Una vez abiertos, los calibradores pueden utilizarse durante 60 días siempre que se los conserve en refrigerador a 2-8 °C y siempre que la permanencia dentro de la máquina no supere las 6 horas por sesión.

No congelar los reactivos ni los calibradores.

PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El análisis debe efectuarse en muestras humanas de suero o plasma (EDTA - heparina).

No utilizar muestras lipémicas, hemolizadas o turbias.

Si transcurren más de 8 horas desde la extracción antes de efectuar el análisis, es necesario separar el suero o el plasma del coágulo, de los glóbulos rojos y de las probetas de separación con gel.

Antes del análisis, las muestras pueden conservarse en refrigerador a 2-8 °C por un máximo de 7 días.

Si el análisis se ha de efectuar después de los 7 días, conservar las muestras congeladas (< -20 °C).

Evítese congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Para un rendimiento analítico fiable, atenerse escrupulosamente a las instrucciones del manual operativo del instrumento.

Cargar los reactivos

Todos los reactivos del kit están listos para usar.

Antes de introducir el cartucho de reactivos en el sistema, es necesario agitar el recipiente de partículas magnéticas mediante rotación horizontal, de manera que las partículas queden en suspensión. Evítese la formación de espuma durante esta operación.

Utilizando la correspondiente guía, colocar el cartucho de reactivos en la zona de reactivos del instrumento; dejar en agitación por lo menos 30 minutos antes de usar.

Al colocar el cartucho de reactivos, simultáneamente se lee el código de barras identificador. Si la etiqueta del cartucho estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos identificadores del cartucho de reactivos se pueden introducir manualmente.

El instrumento mantiene automáticamente en agitación continua las partículas magnéticas. En caso de retirar el cartucho de reactivos del instrumento, conservarlo en posición vertical, a oscuras y a temperatura de 2-8 °C.

Cargar calibradores y controles

Los calibradores y controles ZENIT RA están listos para usar. Dejarlos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agitar suavemente el contenido, manualmente o mediante vortex, evitando que se forme espuma. No invertir el envase y no quitar el tapón perforador de cierre (tapón amarillo para calibradores y tapón verde o azul para controles).

Cuando se usan los calibradores o controles por primera vez, hay que presionar el tapón perforador hacia abajo hasta llegar al tope. De este modo, se perfora la membrana que sella el envase y se podrá extraer el líquido que contiene. Si el tapón perforador ha sido presionado correctamente, quedará oculta la banda de color rojo que hay en la parte superior de la etiqueta (Véase la figura 1: envase sellado y envase perforado). Si los calibradores o controles ya han sido utilizados, el envase tendrá un tapón superior de cierre (tapón blanco) y la banda roja de la etiqueta estará oculta.

En el instrumento se han de cargar únicamente los envases sin tapón superior (tapón blanco) y con la banda roja oculta (Véase figura 1: envase perforado).

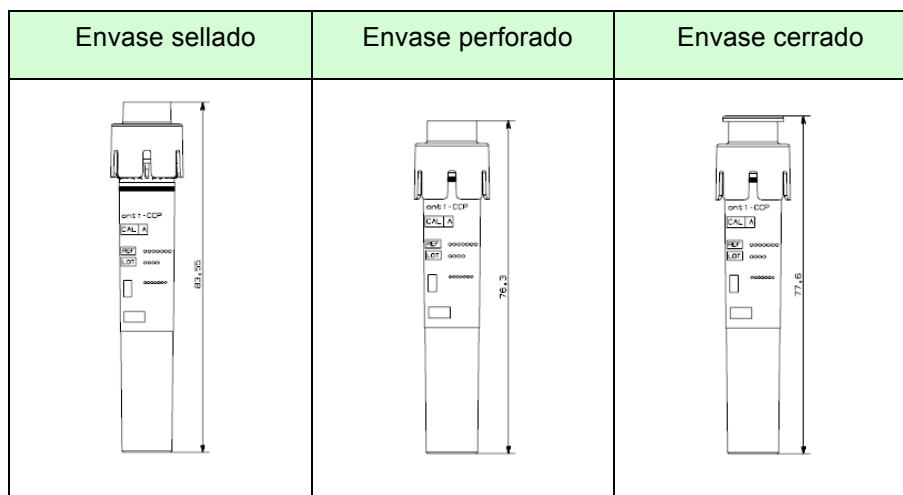
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgG anti- β_2 -glicoproteína I de los calibradores o controles están registrados en el disco de datos y se transfieren automáticamente al analizador. Si los mismos no fueran transferidos, se los puede introducir manualmente.

Al terminar la sesión, los envases de calibradores y controles se han de cerrar con sus tapones superiores (tapones blancos) y se conservarán a 2-8 °C hasta utilizarlos nuevamente (figura 1: envase cerrado).

Los calibradores pueden utilizarse hasta un máximo de cuatro veces.

Figura 1: diseño del envase



Cargar las muestras

Identificar las muestras con el lector de código de barras y colocarlas en el instrumento en el recipiente específico. Si faltara el código de barras en la muestra, o si el mismo no fuera leído, los datos identificadores de la muestra se pueden introducir manualmente.

Para cada muestra, seleccionar los parámetros requeridos.

Calibración

El instrumento *ZENIT RA Analyzer* utiliza una curva de calibración memorizada (curva maestra), generada por el fabricante para cada lote de cartuchos de reactivos.

Los parámetros de la curva maestra, juntamente con los valores de concentración de los calibradores, están memorizados en el disco de datos y se transfieren a la base de datos del instrumento.

Los calibradores A y B se utilizan para recalibrar la curva maestra tanto en función del instrumento utilizado como de los reactivos cargados en la máquina.

Para efectuar la recalibración, analizar por triplicado los dos calibradores A y B, y una sola vez los controles.

Los valores de concentración obtenidos con los controles permiten validar la nueva calibración.

Una vez aceptada y memorizada la recalibración de la curva maestra, todas las muestras sucesivas se pueden analizar sin volver a calibrar, excepto en los siguientes casos:

- cuando en el instrumento se carga un cartucho de reactivos de un lote nuevo;
- cuando los valores de los controles no están dentro del intervalo de aceptabilidad;
- cuando se efectúa el mantenimiento del instrumento;
- cuando ha caducado la validez de la curva maestra recalibrada.

La validez de la curva maestra recalibrada para el kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* es de 15 días.

El instrumento gestiona automáticamente la recalibración.

Análisis

Presionar el botón de puesta en marcha.

1. El sistema aspira 100 μ l de diluyente de muestras, 20 μ l de partículas magnéticas, 100 μ l de diluyente de muestras y 6 μ l de muestra o control (para los calibradores, el suero positivo se suministra ya diluido con el diluyente de muestras; el volumen aspirado es de 106 μ l). Las soluciones y la suspensión aspiradas se dispensan en la cubeta de reacción.
2. La cubeta de reacción se incuba en el rotor a 37 °C durante 10 minutos.
3. Concluida esta fase de incubación, se separan y lavan las partículas magnéticas.
4. En la cubeta se dispensan 200 μ l de conjugado.
5. La cubeta de reacción se incuba en el rotor a 37 °C durante 10 minutos.
6. Concluida esta última fase de incubación, se separan y lavan las partículas magnéticas y se traslada la cubeta a la cámara de lectura.
7. La cantidad de conjugado ligado a la fase sólida, expresada en RLU, es directamente proporcional a la concentración de IgG anti- β_2 -glicoproteína I presente en la muestra.
8. Las respuestas obtenidas se interpolan en la curva de calibración y se convierten en concentraciones.

Las muestras con valores de concentración superiores al límite más alto del intervalo de medición se pueden diluir y volver a analizar. Para calcular el resultado final, el nuevo valor obtenido se multiplica por el factor de dilución utilizado.

CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la validez del análisis, cada día en que se efectúan análisis es necesario medir sueros de control de diferentes niveles de concentración (por lo menos un suero negativo y uno positivo).

Si para la verificación de los resultados del análisis el laboratorio de pertenencia exige un uso más frecuente o un número mayor de controles, síganse los procedimientos de control de calidad establecidos en el laboratorio en cuestión.

Si se utilizan los sueros de control ZENIT RA, los valores medios esperados y los límites de aceptabilidad están indicados en el disco de datos incluido en el paquete de controles.

En caso de que se utilizaran sueros de control diferentes, antes de usarlos es necesario definir los valores esperados con reactivos y sistema ZENIT RA.

Si el valor de los controles no estuviera dentro de los límites de aceptabilidad especificados, los resultados del análisis no son válidos y es necesario volver a analizar las muestras correspondientes.

En este caso, antes de la repetición del análisis se ha de efectuar una nueva calibración.

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Cálculo de resultados

El sistema calcula automáticamente la concentración de anticuerpos IgG anti- β_2 -glicoproteína I presente en las muestras examinadas. Los valores se visualizan tanto leyéndolos en pantalla como imprimiéndolos.

Las concentraciones se expresan en UA/ml.

El cálculo de la concentración de analito en la muestra se efectúa a través de la lectura de la respuesta obtenida para cada muestra, en una curva de calibración elaborada mediante un sistema de ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL, Y ponderado), periódicamente corregida en función de las respuestas obtenidas en el análisis de los calibradores.

Para informaciones detalladas sobre cómo el sistema calcula los resultados, consúltese el manual operativo del sistema.

Interpretación de resultados

Los límites de mensurabilidad del ensayo ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG son: 0,0 – 867 UA/ml.

Los valores inferiores a 0,0 UA/ml son valores extrapolados y se pueden indicar como "iguales a 0,0 UA/ml".

Los valores superiores a 867 UA/ml se pueden indicar como "superiores a 867 UA/ml", o bien volver a analizar las muestras después de diluirlas convenientemente.

Los resultados de las muestras se pueden interpretar como sigue:

(UA/ml)	Interpretación
< 10	La muestra se considerará negativa a la presencia de IgG anti- β_2 -glicoproteína I
10÷20	La muestra se considerará dudosa a la presencia de IgG anti- β_2 -glicoproteína I
> 20	La muestra se considerará positiva a la presencia de IgG anti- β_2 -glicoproteína I

Dichos valores son sólo indicativos. Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites de referencia.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

Para formular un diagnóstico, los resultados obtenidos con el kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG y el sistema ZENIT RA Analyzer se han de evaluar conjuntamente con los demás datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.

La contaminación bacteriana de las muestras y la inactivación por calor pueden influir en el resultado del análisis.

Los anticuerpos heterófilos presentes en las muestras de suero humano pueden reaccionar con los reactivos a base de inmunoglobulina, provocando interferencias en los inmunoensayos *in vitro*. Muestras con estas características pueden dar valores anormales al ser analizadas con el kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG.

Muestras de pacientes afectados de hepatopatías crónicas, infecciones crónicas, colagenopatías y mieloma con hipergammaglobulinemia (concentración de IgG superior a 1800 mg/dl), pueden presentar en algunos casos valores positivos de anti- β_2 -glicoproteína I.

VALORES ESPERADOS

Se analizaron las muestras de 100 pacientes sanos para verificar la presencia de anticuerpos IgG anti- β_2 -glicoproteína I.

99 muestras resultaron negativas (una muestra resultó dudosa), con un valor promedio de 1,5 UA/ml y una desviación estándar de 1,92 UA/ml.

Con los resultados obtenidos se calculó el límite de blanco (LdB = el resultado más alto que podemos esperar en una serie de muestras que no contienen el analito). El límite de blanco, establecido como percentil 95 de la población negativa, resultó equivalente a 3,8 UA/ml con el lote de reactivos nº 2.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Con el kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* se analizaron 244 muestras, 68 de las cuales eran de pacientes afectos de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS), 46 pertenecían a pacientes afectos de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas (7 conectivitis, 15 lupus eritematoso sistémico, 24 artritis reumatoide), 30 muestras eran de pacientes afectos de diferentes patologías infecciosas (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV); 100 muestras eran de individuos normales.

En la población supuestamente negativa estudiada (46 muestras de pacientes afectos de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas, 30 muestras de pacientes con diferentes patologías infecciosas y 100 muestras de individuos normales), 2 muestras resultaron positivas, 7 dudosas y 167 negativas.

- **Especificidad diagnóstica: 94,9 % (167/176)**

En la población supuestamente positiva estudiada (68 muestras de pacientes afectos de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos), 8 muestras resultaron negativas, 3 dudosas y 57 positivas.

- **Sensibilidad diagnóstica: 83,8 % (57/68)**

Según los resultados de especificidad y sensibilidad diagnósticas, **el acuerdo diagnóstico es del 91,8 % (224/244)**.

RENDIMIENTO

Advertencia: los datos que presentamos no representan las especificaciones de funcionamiento del kit, sino que constituyen evidencia experimental de cómo funciona el kit dentro de dichas especificaciones del modo previsto por el fabricante.

Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad del kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* se evaluaron aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP5-A2 de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

La **precisión** se calculó analizando los resultados de 20 repeticiones de 5 sueros (uno negativo y cuatro positivos con diferentes concentraciones de anti- β_2 -glicoproteína I IgG) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anti- β_2 -glicoproteína I IgG negativo (N4) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 2,5 UA/ml y de 0,0 a 1,2 UA/ml respectivamente con los lotes de reactivos nº 1 y 2.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 4 sueros positivos.

Muestra	Nº de lote de reactivos	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
P1	1	27,8	1,00	3,6
	2	30,5	0,84	2,8
P2	1	73,2	1,66	2,3
	2	89,3	2,22	2,5
P3	1	141,0	4,57	3,2
	2	155,0	7,43	4,8
P4	1	282,7	14,19	5,3
	2	301,9	15,28	5,1

La **reproducibilidad** se calculó analizando los resultados de la determinación de cinco sueros (uno negativo y cuatro positivos con diferentes concentraciones de anti- β_2 -glicoproteína I IgG) efectuada una sola vez con dos lotes diferentes de reactivos en 30 sesiones diferentes.

La concentración del suero anti- β_2 -glicoproteína I IgG negativo (N4) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 1,8 UA/ml.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 4 sueros positivos.

Muestra	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
P1	31,2	2,48	7,9
P2	92,1	9,64	10,5
P3	158,9	10,85	6,8
P4	313,2	25,84	8,3

Linealidad de las diluciones

La linealidad de las diluciones del kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG se evaluó aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP6-A de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Se analizaron diluciones escalonadas de 3 sueros con concentración alta de IgG anti- β_2 -glicoproteína I, efectuadas con el diluyente de muestras

En la siguiente tabla se muestran los resultados del estudio.

Muestra	Factor de dilución	Concentración medida (UA/ml)	Concentración esperada (UA/ml)	Recuperación %
1	1	701,6	-	(100)
	2	334,3	350,8	95,3
	4	162,8	175,4	92,8
	8	92,2	87,7	105,1
	16	45,9	43,9	104,6
	32	23,1	21,9	105,5
2	1	694,1	-	(100)
	2	329,0	347,1	94,8
	4	163,8	173,5	94,4
	8	84,6	86,8	97,5
	16	45,6	43,4	105,1
	32	22,4	21,7	103,2
3	1	250,8	-	(100)
	2	135,8	125,4	108,3
	4	70,3	62,7	112,1
	8	38,5	31,4	122,6

De todos modos, es necesario subrayar que algunos sueros, cuando se los mide en diluciones diferentes, pueden dar resultados no lineales dentro de los límites de mensurabilidad, pues el resultado no depende sólo de la concentración sino también de la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG, expresada en cuanto **límite de detección** (LdD: la cantidad más pequeña de analito que el método puede medir), se evaluó aplicando un protocolo basado en las directivas del documento EP17-A de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y la fórmula de cálculo $LdD = LdB + C_{\beta} DE_s$ (donde LdB representa el valor de límite de blanco, DE_s la desviación estándar estimada de la distribución de la muestra de baja concentración, y C_{β} deriva del percentil 95 de la distribución estándar de Gauss).

Se utilizaron 4 muestras de baja concentración de analito, determinadas separadamente con dos lotes de reactivos diferentes, en 30 análisis diferentes.

El límite de detección del kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG resultó equivalente a 8,1 UA/ml.

Los valores del límite de detección, junto con consideraciones de carácter clínico y los resultados de comparación con métodos de referencia contribuyeron a la definición del valor cut-off.

Especificidad analítica: interferencias

Un estudio basado en las directivas del documento EP7-A2 del CLSI demostró que el rendimiento del análisis no se ve influido por la presencia en la muestra de las sustancias potencialmente interferentes enumeradas en la tabla siguiente, hasta la concentración experimentada.

Sustancias potencialmente interferentes	Máxima concentración experimentada
Bilirrubina libre	20 mg/dl
Bilirrubina conjugada	28 mg/dl
Hemoglobina	1000 mg/dl
Ácidos grasos	3000 mg/dl

Se aconseja no analizar muestras lipémicas, hemolizadas o turbias.

Especificidad analítica: reacciones cruzadas

Para evaluar las reacciones cruzadas potenciales del antígeno utilizado para sensibilizar las micropartículas se efectuó un estudio en 23 muestras, todas con niveles altos de otros autoanticuerpos y negativas a anti- β_2 -glicoproteína I IgG.

Las muestras analizadas se dividían de la siguiente manera: SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), histones (1), nucleolares (1), Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (2), MPO (1), PR3 (1).

El estudio no mostró ninguna reacción cruzada significativa del antígeno en fase sólida con los demás autoanticuerpos.

Efecto de saturación en dosis muy altas

Algunos inmunoensayos utilizados para determinar muestras con concentraciones muy altas de analito pueden dar niveles aparentes de analito bajo (efecto *hook*).

El método utilizado en el kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG, al ser un método de dos incubaciones, no resiente de dicho efecto.

Una muestra con concentración sumamente alta (por encima de los límites de medición) de IgG anti- β_2 -glicoproteína I confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 1076 UA/ml.

Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anti- β_2 -glicoproteína I IgG se determinó analizando 226 muestras tanto con el kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG como con un ensayo ELISA disponible en comercio. De dichas muestras, 60 eran de pacientes afectados de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS); 41 eran de pacientes afectados de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas; 27 muestras eran de pacientes con diferentes patologías infecciosas; 98 muestras eran de individuos normales.

En 6 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis ZENIT RA y el ensayo ELISA disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 97,3 % (220/226).

La **sensibilidad relativa** resultó del 93,0 % (53/57).

La **especificidad relativa** resultó del 98,8 % (167/169).

BIBLIOGRAFÍA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β_2 -glicoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.
7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.
8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.
9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β_2 -Glicoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18, 5166-5174.

11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. EMBO J 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. Lancet 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. AM J Med, 1992; 93, 181-186.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italia

ESPAÑA

Distribuido por

Menarini Diagnosticos S.A.
Avda del Maresme, 120 - 08918 Badalona - Barcelona
Tel. +34 93 50 71 000 - Fax +34 93 27 80 215
www.menarinidiag.es