




	ZENIT RA CCP	Distribuido por 
INSTRUCCIONES DE USO	   100	

USO PREVISTO

El ensayo *ZENIT RA CCP* es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa, mediante el instrumento *ZENIT RA Analyser*, de los anticuerpos específicos de clase IgG contra el péptido cíclico citrulinado (CCP) en muestras de suero o plasma humano (EDTA, heparina). Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación de la artritis reumatoide (AR).

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 artritis reumatoide (AR) es una poliartritis inflamatoria crónica, progresiva, de patogénesis autoinmune, que afecta a las articulaciones sinoviales. Se trata de una de las enfermedades autoinmunes más difundidas (1-2 % de la población europea); en la mayor parte de los casos, la evolución clínica desemboca en un serio menoscabo de la función articular con graves formas de invalidez. El diagnóstico precoz de AR reviste una gran importancia clínica, dado que la aplicación de una terapia en el estadio inicial de la enfermedad ha demostrado ser eficaz para limitar o reducir el avance de las lesiones, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Junto al factor reumatoide (FR)⁽¹⁾, marcador serológico sensible aunque poco específico, recientemente se investigan también los autoanticuerpos anti-péptido citrulinado (anticitrulina o CCP)⁽²⁾, que son muy específicos y por tanto muy útiles para el diagnóstico y el pronóstico en pacientes con artritis reumatoide.

La citrulinación es un proceso bioquímico que se produce como consecuencia de hechos flogísticos y cuyo objetivo son las proteínas de la cavidad articular. La reacción es catalizada por la enzima peptidil arginina desaminasa (PAD), dependiente del calcio, que produce la desaminación de los residuos de arginina de la filagrina (proteína filamentosa aglutinada interesada en la organización del citoesqueleto de las células epiteliales escamosas) y de las demás proteínas de la cavidad. Después de estas modificaciones, los residuos citrulinados son reconocidos por los anticuerpos específicos⁽³⁾.

La citrulinación de las proteínas presentes en la cavidad articular es un proceso común a todos los derrames⁽⁴⁾, pero únicamente los individuos con predisposición genética a desarrollar AR (HLA de clase DRB1) producen autoanticuerpos contra los péptidos citrulinados⁽⁵⁾.

Estos autoanticuerpos tienen una especificidad muy alta para AR. En los primeros ensayos ELISA, se utilizó como recubrimiento péptidos de síntesis de primera generación (CCP1), que para AR demostraron una buena sensibilidad (50-60 %) y especificidad (95-99 %)⁽⁶⁾. El empleo de péptidos citrulinados cíclicos de segunda generación (CCP2) mejoró notablemente la sensibilidad para AR (80 %), conservando la elevada especificidad (98-99 %)⁽⁷⁾.

El notable rendimiento de los análisis de segunda generación mediante CCP está documentado en un número muy importante de trabajos científicos publicados en los últimos años; es probable que la especificidad sea aún más alta de lo que indica la literatura, porque se ha demostrado que la positividad a anti-CCP se manifiesta hasta 10 años antes de la aparición de los síntomas de AR⁽⁸⁾. Por tanto, un título alto de anticuerpos anti-CCP en un individuo asintomático debe considerarse predictor de AR antes que un falso positivo.

Los anticuerpos anti-CCP demostraron poseer gran valor predictor también en el desarrollo de lesiones articulares erosivas; en efecto, los anticuerpos anti-CCP parecen ser el único parámetro inicial (incluyendo también los parámetros clínicos) capaz de indicar que el paciente está evolucionando hacia una forma erosiva de AR⁽⁹⁾.

Su determinación es útil también para diagnosticar la AR infantil y para diferenciar la AR de las colagenopatías con artritis concomitante⁽¹⁰⁾.

El uso de los anti-CCP asociado a la determinación del FR aumenta al máximo la relación sensibilidad/especificidad. Es importante no olvidar que el 15-20% de las AR resultan positivas al FR pero negativas a los anti-CCP, y que aproximadamente la mitad de las AR negativas al FR resultan positivas a los anti-CCP. La positividad simultánea a FR y CCP tiene un valor predictor positivo del 100 %.

En cuanto a la monitorización de los pacientes con AR anti-CCP positivos, parece ser que la determinación serial de estos autoanticuerpos no guarda relación con el desarrollo clínico y la respuesta a los medicamentos.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit *ZENIT RA CCP* para la determinación cuantitativa de las IgG específicas anti-CCP utiliza un método inmunológico indirecto de dos fases, basado en el principio de la quimioluminiscencia.

El antígeno específico 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-CCP 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, en los calibradores y los 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 antígeno CCP (péptido cíclico citrulinado) 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 inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO₄ como conservantes.

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

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anti-CCP 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-CCP 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 Cód. nº 41566
300 tapones superiores para cerrar los envases de calibradores después de usarlos por primera vez.

(*) 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 CCP CONTROL SET Cód. nº 41451
3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anti-CCP.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos del kit *ZENIT RA CCP* 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).

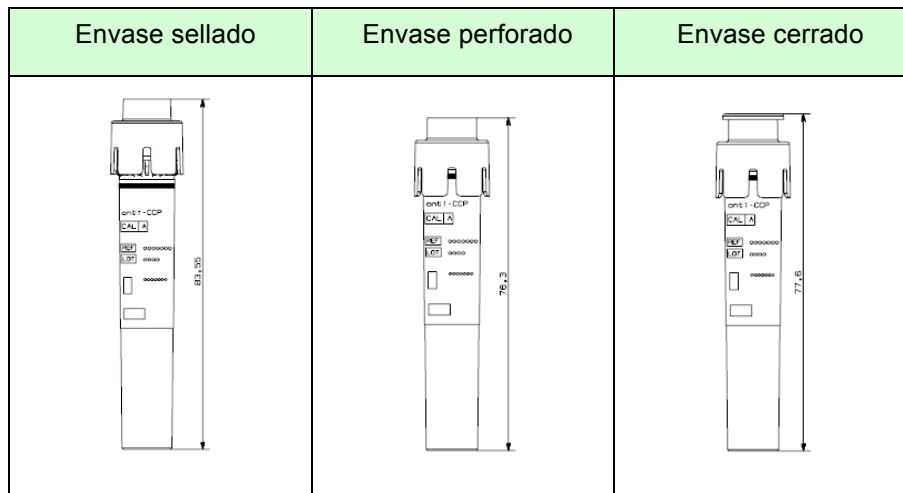
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgG anti-CCP 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 proceso de 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 CCP* es de 15 días.

El instrumento gestiona automáticamente la recalibración.

Análisis

Presionar el botón de puesta en marcha.

1. El sistema aspira 100 µl de diluyente de muestras, 20 µl de partículas magnéticas, 100 µl de diluyente de muestras y 4 µl de muestra o control (para los calibradores, el suero positivo se suministra ya diluido con el diluyente de muestras; el volumen aspirado es de 104 µl). 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 µl 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-CCP 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-CCP 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 CCP* son: 0.0 – 320 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 320 UA/ml se pueden indicar como "superiores a 320 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
< 5	La muestra se considerará negativa a la presencia de IgG anti-CCP
≥ 5	La muestra se considerará positiva a la presencia de IgG anti-CCP

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 CCP* 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 CCP*.

VALORES ESPERADOS

Se analizaron las muestras de 100 donantes seleccionados al azar para verificar la presencia de anticuerpos IgG anti-CCP.

Todas las muestras resultaron negativas, con un valor promedio de 0,25 UA/ml y una desviación estándar de 0,388 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 1,2 UA/ml con el lote de reactivos nº 1.

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 CCP* 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-CCP IgG) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anti-CCP IgG negativo (RIP1) estuvo comprendida en el intervalo de 1,7 a 2,7 UA/ml y de 1,8 a 2,3 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 %
RIP2	1	6,6	0,17	2,5
	2	6,7	0,32	4,8
RIP3	1	25,7	1,00	3,9
	2	26,4	1,09	4,1
RIP4	1	51,1	2,03	4,0
	2	52,4	2,02	3,9
RIP5	1	106,5	3,92	3,7
	2	107,6	3,20	3,0

La **reproducibilidad** se calculó analizando los resultados de la determinación de cinco sueros (uno negativo y cuatro positivos con diferentes concentraciones de anti-CCP IgG) efectuada una sola vez con dos lotes diferentes de reactivos en 40 sesiones diferentes.

La concentración del suero anti-CCP IgG negativo (RIP1) estuvo comprendida en el intervalo de 1,4 a 2,7.

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

Muestra	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
RIP2	7,8	0,37	4,7
RIP3	29,4	1,51	5,1
RIP4	57,9	3,24	5,6
RIP5	116,6	5,58	4,8

Linealidad de las diluciones

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

Se dosificaron diluciones escalonadas de 3 sueros con concentración alta de IgG anti-CCP, 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	251,9	-	(100)
	2	129,9	126,0	103,1
	4	65,8	63,0	104,4
	8	36,0	31,5	114,3
	16	19,8	15,7	126,1
	32	10,6	7,9	134,2
2	1	170,3	-	(100)
	2	86,8	85,2	101,9
	4	45,8	42,6	107,5
	8	22,7	21,3	106,6
	16	11,9	10,6	112,3
	32	6,4	5,3	120,8
3	1	239,2	-	(100)
	2	130,1	119,6	108,8
	4	65,3	59,8	109,2
	8	31,7	29,9	106,0
	16	15,9	15,0	106,0
	32	7,4	7,5	98,7

De todos modos, es necesario subrayar que no todos los sueros, cuando se los mide en diluciones diferentes, pueden dar resultados lineales dentro del intervalo 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 CCP*, 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 40 análisis diferentes.

El límite de detección del kit *ZENIT RA CCP* resultó equivalente a 2,1 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.

Se demostró, además, que la presencia de factor reumatoide (FR) hasta una concentración de 513 UI/ml no interfiere en el análisis.

Especificidad analítica: reacciones cruzadas

Para evaluar las reacciones cruzadas potenciales del antígeno utilizado para sensibilizar las micropartículas se efectuó un estudio en 25 muestras, todas con niveles altos de otros autoanticuerpos y negativas a anti-CCP IgG.

Las muestras utilizadas se dividían de la siguiente manera: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (1), histones (2), nucleolares (1), MPO (1), PR3 (1), β_2 -GPI/CL IgG (2) y gliadina/t-TG (3).

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 puede dar niveles aparentes de analito bajo (efecto *hook*).

El método utilizado en el kit *ZENIT RA CCP*, 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-CCP confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 1511UA/ml.

Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anti-CCP IgG se determinó analizando 288 muestras tanto con el kit *ZENIT RA CCP* como con un ensayo ELISA disponible en comercio.

En 9 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis ZENIT RA y el ensayo ELISA disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 96,9 % (279/288).

La **sensibilidad relativa** resultó del 95,7 % (88/92).

La **especificidad relativa** resultó del 97,4 % (191/196).

BIBLIOGRAFÍA

1. Wener MH. Rheumatoid Factors. Manual of Clinical Laboratory Immunology, NR Rose et al. American Society of Microbiology Press, 961-972 (2002).
2. Schellekens GA, Visser H, De Jong BA, Van de Hoogen FH, Hazens JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
3. Baeten D, Peene I, Union A, Sebbag M, Serre G, Veys EM, et al. Specific presence of intracellular citrullinate proteins in rheumatoid arthritis synovium : relevance of to antifilaggrin antibodies. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2218-62.
4. Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 641-6.
5. Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3058-62.
6. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001; 47: 1089-93.
7. Van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1510-2.
8. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2741-9.
9. Visser H, le Cessie S, Vos K et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.

10. Jansen LMA, van der Horst-Bruinsma IE, van Shaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, Dukmans BAC. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. J Rheumatol 2002; 29(10): 2074-2076.



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