


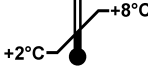




REF 41425 	ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM		Distribuido por: 
INSTRUCCIONES DE USO		  100	

USO PREVISTO

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

Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación del síndrome de 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 arteriales, 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, puede definirse el diagnóstico de APS en presencia de por lo menos un criterio clínico y uno de laboratorio.

Los criterios de laboratorio contemplan la positividad persistente en el tiempo (12 semanas) con título medio/alto de anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anticuerpos anti-β2-glicoproteína I (aβ2GPI), o anticuerpos anticoagulante lúpico (LAC).

Los anticuerpos aCL y a-β2GPI pueden ser de isotipo G o bien 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 extractos de corazón bovino del análisis VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) considerado específico para el diagnóstico de sífilis.

La especificidad del análisis VDRL fue puesta en tela de juicio por haberse dado muchos casos falsos positivos en muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas que no padecían de enfermedades venéreas. En 1983, Harris *et al.*³, utilizando un método de alta sensibilidad para determinar los anticuerpos anticardiolipina, encontraron grandes concentraciones de aCL en el 61 % de los pacientes afectados de LES, demostrando una significativa correlación entre niveles de anticuerpo y trombosis venosas y arteriales, el anticoagulante lúpico y la trombocitopenia.

En 1990, dos grupos independientes de investigadores^{4,5} demostraron que para destacar los anticuerpos anticardiolipina es indispensable la presencia de la β 2-glicoproteína I.

La β 2-glicoproteína I tiene un peso molecular aproximado de 50 kDa, una concentración plasmática de alrededor de 0,15-0,30 mg/ml y una función biológica todavía oscura (parecería poder modular el metabolismo de las lipoproteínas, interferir en algunas reacciones de coagulación y tener efecto antiagregante de plaquetas⁶⁻⁹). Estudios cristalográficos recientes definieron la estructura tridimensional de la proteína y su organización en 5 dominios¹⁰⁻¹¹, proporcionando útiles informaciones acerca del funcionamiento de esta molécula.

El V dominio en particular presenta numerosos residuos de lisina, responsables de la interacción electrostática de la β 2-glicoproteína I con los fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares¹². Mediante el mismo mecanismo, se produce *in vitro* el ligado entre la β 2-glicoproteína y la cardiolipina adsorbida en la fase sólida. Está ampliamente demostrado que los anticuerpos anticardiolipina de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos reconocen una porción modificada de la β 2-glicoproteína I; dichos autoanticuerpos no pueden reconocer la cardiolipina, la β 2-glicoproteína nativa no ligada en fases sólidas o en otras estructuras^{4,5,13-15}.

Los conocimientos adquiridos hasta este momento, nos permiten definir los anticuerpos anti-cardiolipina como anticuerpos capaces de ligarse a neoepítomos generados por la unión entre β 2-glicoproteína y cardiolipina adsorbida en una fase sólida.

Con posterioridad se demostró^{4,16} que, en pacientes con enfermedades autoinmunes, los anticuerpos anticardiolipina pueden reconocer la β 2-glicoproteína I directamente adsorbida en microplacas de polistireno tratado con UV o irradiado. También en este caso, el reconocimiento de la molécula por parte de los autoanticuerpos está determinado por las modificaciones estructurales provocadas por el ligado de la proteína en la fase sólida.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* para la determinación cuantitativa de las IgM específicas anticardiolipina dependientes de β 2-glicoproteína I utiliza un método inmunológico indirecto de dos pasos, basado en el principio de la quimioluminiscencia.

El complejo cardiolipina- β 2-glicoproteína I se utiliza para recubrir las partículas magnéticas (fase sólida); un anticuerpo anti-IgM 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-cardiolipina IgM 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 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 con complejo cardiolipina- 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-IgM 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 citrato-fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante amarillo, azida de sodio (< 0,1%) como conservante.

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

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anticardiolipina IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, azida de sodio (< 0,1%) como conservante.

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

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anticardiolipina IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, azida de sodio (< 0,1%) como conservante.

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 MPL U/ml (unidades MPL) y están calibradas frente a los sueros de referencia "Harris". 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 * Cód. nº 41402
Paquete de 960 cubetas.
- ZENIT RA System Liquid * Cód. nº 41409
1 botella de 0,5 litro de solución 10x.
- ZENIT RA Wash Solution * Cód. nº 41407
1 botella de 0,5 litro de solución 20x.
- ZENIT RA Trigger Set * Cód. nº 41403
1 frasco de 250 ml de Trigger A (solución de preactivación)
1 frasco de 250 ml de Trigger B (solución de activación)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cód. nº 41436
Paquete de 2 botellas de 1 litro de solución lista para usar.

- 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 APS IgM CONTROL SET Cód. nº 41454

3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anticardioplipina.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos del kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* 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 de suero o plasma humano (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 ni 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).

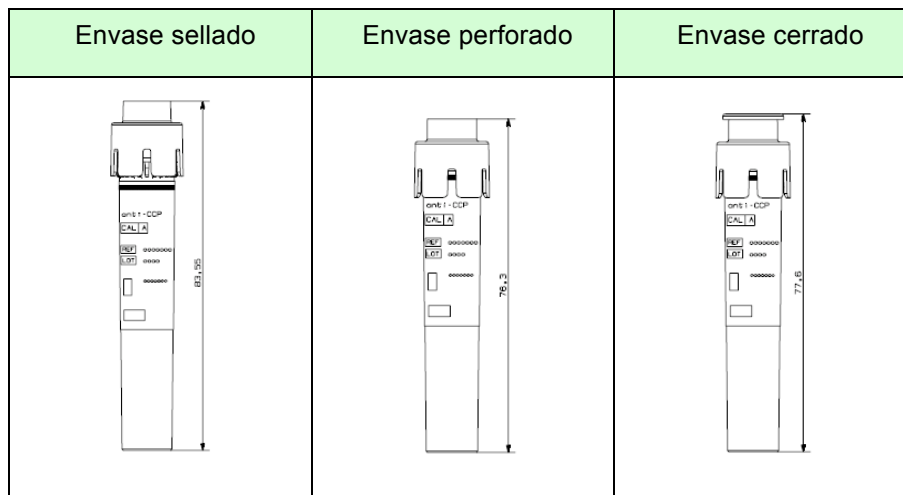
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgM anti-cardiolipina 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 CARDIOLIPIN IgM* 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 6 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 106 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 IgM anticardiolipina 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 de que se trate.

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 IgM anticardiolipina presente en las muestras examinadas. Los valores se visualizan tanto leyéndolos en pantalla como imprimiéndolos.

Las concentraciones se expresan en MPL U/ml.

El cálculo de la concentración de analito en la muestra se efectúa leyendo 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 CARDIOLIPIN IgM* son 0,0 – 300 MPL U/ml.

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

Los valores superiores a 300 MPL U/ml se pueden indicar como "superiores a 300 MPL U/ml", o bien volver a analizar las muestras después de diluirlas convenientemente.

Los resultados de las muestras se pueden interpretar como sigue:

(MPL U/ml)	Interpretación
< 10	La muestra se considerará negativa a la presencia de IgM anticardiolipina
≥ 10	La muestra se considerará positiva a la presencia de IgM anticardiolipina

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 CARDIOLIPIN IgM* 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 anómalos al ser analizadas con el kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*.

VALORES ESPERADOS

Se analizaron las muestras de 99 donantes seleccionados al azar para verificar la presencia de anticuerpos IgM anticardiolipina.

Todas las muestras analizadas resultaron negativas, con un valor promedio de 1,3 MPL U/ml y una desviación estándar de 1,48 MPL U/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 4,3 MPL U/ml con el lote de reactivos nº 2.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Con el kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* se analizaron 344 muestras, de las cuales 68 eran de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS); 46 eran de pacientes afectados de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas (7 conectivitis, 15 lupus eritematoso sistémico, 24 artritis reumatoidea); 30 muestras pertenecían a pacientes con diferentes patologías infecciosas (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV); 100 muestras eran de individuos normales y 100 de donantes.

En la población supuestamente negativa estudiada (46 muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas, 30 muestras de pacientes afectados de diferentes patologías infecciosas, 100 muestras de individuos normales y 100 muestras de donantes), 7 muestras resultaron positivas y 269 negativas.

- **Especificidad diagnóstica: 97,5 % (269/276)**

En la población supuestamente positiva estudiada (68 muestras de pacientes afectados de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos), 41 muestras resultaron negativas y 27 positivas.

- **Sensibilidad diagnóstica: 39,7 % (27/68)**

Según los resultados de especificidad y sensibilidad diagnósticas, **el acuerdo diagnóstico es del 86,0 % (296/344)**.

De las 68 muestras de pacientes afectados de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, 58 resultaron positivas analizadas con el kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG* (85,3 %).

RENDIMIENTO

Advertencia: los datos que presentamos no reflejan 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 CARDIOLIPIN IgM* 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 anticardiolipina IgM) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anticardiolipina IgM negativo (N3) estuvo comprendida en el intervalo entre 0,0 y 0,0 MPL U/ml y entre 0,0 y 0,0 MPL U/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 (MPL U/ml)	DE	CV %
P1	1	22,2	1,16	5,2
	2	20,8	0,92	4,4
P2	1	47,8	2,50	5,2
	2	44,8	1,06	2,4
P3	1	88,3	5,94	6,7
	2	87,2	3,54	4,1
P4	1	182,2	7,83	4,3
	2	176,3	4,07	2,3

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

La concentración del suero anticardiolipina IgM negativo (N3) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 2,3 MPL U/ml.

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

Muestra	Concentración media (MPL U/ml)	DE	CV %
P1	22,9	2,14	9,3
P2	54,6	4,15	7,6
P3	131,2	8,79	6,7
P4	162,2	14,68	9,1

Linealidad de las diluciones

La linealidad de las diluciones del kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* 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 IgM anticardiolipina, efectuadas con el diluyente de muestras.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del estudio.

Muestra	Factor de dilución	Concentración medida (MPL U/ml)	Concentración esperada (MPL U/ml)	Recuperación %
1	1	86,5	-	(100)
	2	40,6	43,3	93,8
	4	20,7	21,6	95,8
2	1	202,8	-	(100)
	2	81,0	101,4	79,9
	4	39,9	50,7	78,7
	8	19,0	25,4	74,8
3	1	64,4	-	(100)
	2	33,5	32,2	104,0
	4	16,1	16,1	100,0

Es necesario subrayar que algunos sueros, cuando se los mide en diluciones diferentes, pueden dar resultados no 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 CARDIOLIPIN IgM*, 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 en 15 ensayos diferentes.

El límite de detección del kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* resultó equivalente a 6,8 MPL U/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 ensayada.

Sustancias potencialmente interferentes	Máxima concentración ensayada
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 24 muestras, todas con niveles altos de otros autoanticuerpos y negativas a anticardiolipina IgM.

Las muestras utilizadas 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 (2), 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 CARDIOLIPIN IgM*, 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 IgM anticardiolipina confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 593 MPL U/ml.

Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anticardiolipina IgM se determinó analizando 245 muestras tanto con el kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* como con un ensayo ELISA disponible en comercio. De dichas muestras, 69 eran de pacientes afectados de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS); 46 pertenecían a pacientes afectados de enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas; 30 eran de pacientes con diferentes patologías infecciosas, y 100 pertenecían a individuos normales

En 12 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis ZENIT RA y el ensayo ELISA disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 95,1 % (233/245).

La **sensibilidad relativa** resultó del 92,3 % (24/26).

La **especificidad relativa** resultó del 95,4 % (209/219).

Calibración y preparaciones de referencia

El sistema está calibrado frente a los sueros de referencia "HARRIS" (artículo nº 6495GM, lote nº 021008), internacionalmente reconocidos.

La cantidad de anticuerpos anticardiolipina IgM presentes en el reactivo de referencia "Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 20 µg/ml (CDC, Cat. No. IS2718, Lot no. 05-0059 09/20/05)", reconstituido con 0,5 ml (concentración proteica: 20 µg/ml), analizada con el kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*, resultó de 300 MPL U/ml.

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-glicoprotein 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-glicoprotein 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