


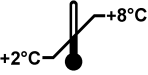




<b>REF 41429</b> 	<h1>ZENIT RA PR3</h1>	Distribuido por 
<b>INSTRUCCIONES DE USO</b>	   50	

## USO PREVISTO

El ensayo *ZENIT RA PR3* es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa, mediante el instrumento *ZENIT RA Analyser*, de los anticuerpos específicos de clase IgG contra la proteinasa 3 (PR3) en muestras de suero o plasma humano (EDTA, heparina).

Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación de las vasculitis primitivas sistémicas asociadas a ANCA, en especial la granulomatosis de Wegener (GW).

**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

Los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) están dirigidos contra antígenos contenidos en el citoplasma de granulocitos y monocitos<sup>(1)</sup>. Los ANCA son un marcador serológico de algunas vasculitis necrotizantes de los vasos de pequeño o mediano calibre: entre ellas, la granulomatosis de Wegener (GW), la poliangiitis microscópica (PAM), la glomerulonefritis necrotizante extracapilar pauciinmune (GNNEP, una forma de PAM limitada al riñón) y, en menor medida, el síndrome de Churg-Strauss (SCS); con frecuencia, se definen colectivamente como "vasculitis asociadas a ANCA" (VAA)<sup>(2)</sup>.

Numerosas evidencias, tanto clínicas como experimentales, indicarían un papel patogénico de los ANCA en las VAA, especialmente en el caso de ANCA-MPO<sup>(3)</sup>.

Con el método estándar de inmunofluorescencia indirecta (IFI), aplicado a neutrófilos humanos normales fijados con etanol absoluto, pueden reconocerse dos cuadros fluoroscópicos principales: C-ANCA y P-ANCA. Con menos frecuencia, se detectan otros dos patrones fluoroscópicos, C-ANCA atípico y ANCA-At, generalmente no asociados a una vasculitis idiopática<sup>(4)</sup>.

En los pacientes afectados de VAA los principales blancos antigénicos de los ANCA son la mieloperoxidasa (MPO) y la proteinasa 3 (PR 3)<sup>(5,6)</sup>.

La MPO es una enzima con importantes propiedades bactericidas, que a través de la catálisis de reacciones de peroxidación determina la formación de productos tóxicos como HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales del oxígeno. Además, el ácido hipocloroso y sus metabolitos pueden inactivar los inhibidores de las proteasas y, por tanto, desempeñar un papel en la degradación de los tejidos y en el mantenimiento de un microambiente inflamatorio<sup>(3)</sup>. La MPO representa alrededor del 5% del contenido proteico total de los neutrófilos; es una molécula fuertemente catiónica constituida por un etero dímero de P.M. ~ 140 kDa.

La PR3 es una serín proteasa débilmente catiónica contenida en los gránulos primarios (o azulófilos) de granulocitos y monocitos, constituida por 228 aminoácidos y con P.M. 29-31 kDa, dotada de actividad microbicida de bacterias y hongos. La mayoría de sus funciones biológicas depende de la actividad proteolítica. En un contexto inflamatorio, es liberada fuera de la célula junto con otros constituyentes de los gránulos y radicales del oxígeno, donde puede degradar el colágeno, los proteoglicanos y otros constituyentes del tejido conectivo. Una actividad proteolítica excesiva, prolongada o inadecuada provoca daños al organismo<sup>(3)</sup>. Los ANCA-PR3 interfieren con la inhibición enzimática de la PR3 por parte de su inhibidor fisiológico  $\alpha$ 1-antitripsina.

En la mayoría de los casos, el patrón C-ANCA se debe a la presencia de anticuerpos específicos a la PR3; un cuadro P-ANCA, por su parte, puede ser causado por anticuerpos dirigidos contra numerosas proteínas, de las cuales la más frecuente es la MPO. En la actualidad, los ANCA dirigidos contra otros componentes citoplasmáticos, diferentes de PR3 y MPO, no tienen un claro significado clínico y por tanto no resultan útiles en el diagnóstico de laboratorio de las VAA<sup>(7,8)</sup>.

Después de la publicación de los resultados del informe multicéntrico para estandarización de los métodos para determinar los ANCA<sup>(9)</sup>, se elaboraron las directivas para la correcta ejecución y redacción de informes de los análisis ANCA en pacientes en que se sospechaba vasculitis; para ampliar, consúltense dichas directivas<sup>(4,10,11)</sup>. Según cuanto surge claramente del mencionado estudio, cuyos resultados se vieron ampliamente confirmados sucesivamente, para la correcta determinación de los ANCA se utilizan, combinándolos, el método IFI y la identificación de la especificidad antigénica reconocida mediante sistemas específicos para los dos antígenos principales MPO y PR3 (métodos ELISA, FEIA, CLIA)<sup>(12,13)</sup>.

La ejecución combinada de ambos métodos permite obtener una especificidad > 98% incluso en patologías de control, muy superior a la que se logra con los ensayos utilizados separadamente.

El título de los ANCA guarda relación, si bien con algunas excepciones, con la actividad de la enfermedad; por consiguiente, se recomienda utilizar métodos cuantitativos de análisis de ANCA-MPO o ANCA-PR3<sup>(14)</sup> para el control de los pacientes.

La especificidad de los ANCA (MPO o PR3) no permite diferenciar las varias VAA (GW, PAM, GNNEP, SCS); de todos modos, la presencia de P-ANCA/MPO-ANCA inclina más hacia el diagnóstico de PAM o de GNNEP, mientras que la positividad a C-ANCA/PR3-ANCA se asocia más frecuentemente a la GW.

En la GW y en la PAM (incluida la forma limitada al riñón), en fase activa la prevalencia de ANCA es del 70-90%; en cambio, en la SCS los ANCA están presente sólo en  $\approx$  40% de los pacientes, con la MPO como especificidad antigénica predominante.

En cuanto a la utilidad diagnóstica del dato de laboratorio, es conveniente recordar que los valores predictores positivo y negativo (VPP, VPN) dependen, además de la sensibilidad y especificidad del análisis, de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada. Un pedido adecuado (alta probabilidad pre-ensayo) permite obtener un resultado verdaderamente útil clínicamente y disminuye sensiblemente la posibilidad de resultados falsamente positivos<sup>(15)</sup>.

Por consiguiente, la investigación de ANCA debería efectuarse en presencia de una sospecha clínica fundada; un resultado positivo, en sí mismo no suficiente para el diagnóstico de VAA, debe ser evaluado conjuntamente con los datos clínicos e histológicos.

En la literatura se señalan ocasionalmente resultados ANCA positivos en patologías diferentes de las vasculitis asociadas a ANCA, aunque no siempre confirmadas mediante demostración de la especificidad antigénica para MPO o PR3.

Son numerosas las patologías que se han de considerar en el diagnóstico diferencial; entre las mismas, es conveniente recordar, por su elevada frecuencia, las patologías infecciosas y en especial la endocarditis bacteriana subaguda. Pese a que generalmente el VPN de un resultado negativo es alto, esto no excluye totalmente la posibilidad de una VAA, sobretodo en pacientes con marcada evidencia clínica de vasculitis primitiva sistémica <sup>(16)</sup>.

## PRINCIPIO DEL MÉTODO

---

El kit *ZENIT RA PR3* para la determinación cuantitativa de las IgG específicas anti-PR3 utiliza un método inmunológico indirecto de dos pasos, 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-PR3 IgG sequestrati dalla fase solida.

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 PR3 (proteínasa 3) en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras, tensoactivo, Pro-Clin 300 y azida de sodio (< 0,1 %) como conservantes.

REAG	2	CONJ	15 ml
------	---	------	-------

Anticuerpo monoclonal de cabra 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 SO<sub>4</sub> como conservantes.

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

Suero humano con baja concentración de anticuerpos anti-PR3 IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO<sub>4</sub> como conservantes.

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

Suero humano con alta concentración de anticuerpos anti-PR3 IgG en tampón fosfato que contiene seroalbúmina bovina, un tensoactivo, un colorante azul inerte, Pro-Clin 300 y gentamicina SO<sub>4</sub> 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 \* 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 ANCA/GBM CONTROL SET Cód. nº 41449  
3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anti-PR3.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Los reactivos del kit *ZENIT RA PR3* 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).

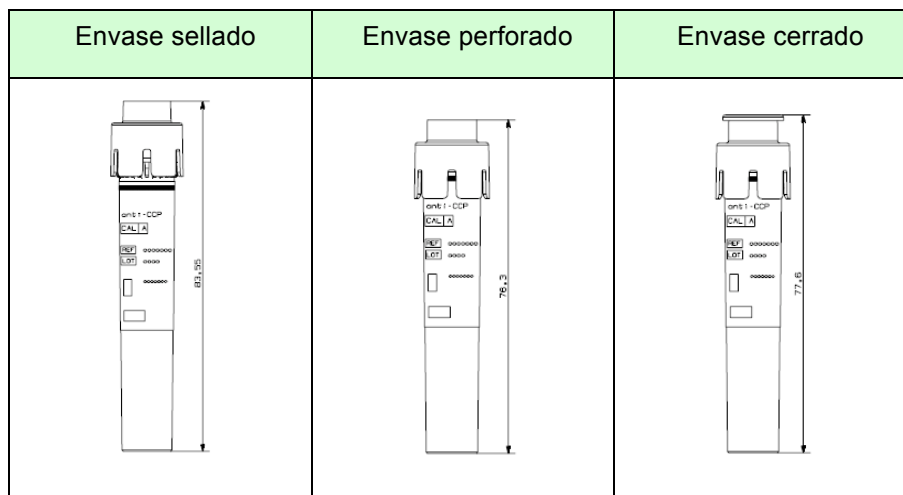
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgG anti-PR3 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 PR3* es de 15 días.

El instrumento gestiona automáticamente la recalibración.

### Análisis

Presionar el botón de puesta en marcha.

1. El sistema aspira 80 µl de diluyente de muestras, 40 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 IgG anti-PR3 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-PR3 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 PR3 son 0,0 – 1067 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 1067 UA/ml se pueden indicar como "superiores a 1067 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-PR3
10÷20	La muestra se considerará dudosa a la presencia de IgG anti-PR3
> 20	La muestra se considerará positiva a la presencia de IgG anti-PR3

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 PR3* 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 PR3*.

---

## VALORES ESPERADOS

---

Se analizaron las muestras de 99 donantes seleccionados al azar para verificar la presencia de anticuerpos IgG anti-PR3.

Todas las muestras resultaron negativas, con un valor promedio de 1,0 UA/ml y una desviación estándar de 1239 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 3,5 UA/ml con el lote de reactivos nº 1.

---

## SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

---

Con el kit *ZENIT RA PR3* se analizaron 333 muestras, de las cuales 50 eran de pacientes con vasculitis primitiva sistémica asociada a ANCA diagnosticada como granulomatosis de Wegener (GW); 45 eran de pacientes con vasculitis primitiva sistémica asociada a ANCA diagnosticada como poliangeioitis microscópica (PAM); 109 eran de pacientes afectados de varias patologías (14, de enfermedades inflamatorias intestinales crónicas; 44, de lupus eritematoso sistémico; 7, de conectivitis sistémicas; 20, de vasculitis no asociadas a ANCA; 10, de artritis reumatoide; 14 de patologías infecciosas), 30 muestras de pacientes normales y 99 muestras de donantes.

En la población supuestamente negativa estudiada (45 muestras de pacientes con diagnóstico de PAM, 109 de pacientes que sufrían de varias patologías no asociadas a ANCA, 30 muestras de individuos normales y 99 muestras de donantes), 9 muestras resultaron positivas, 8 dudosas y 266 negativas..

- **Especificidad diagnóstica: 94,0 % (266/283)**

De las 17 muestras no negativas, 7 pertenecían al grupo de pacientes con diagnóstico PAM, 9 al grupo de pacientes con diferentes patologías y una al grupo de individuos normales.

En la población supuestamente positiva estudiada (50 muestras de pacientes con diagnóstico de GW), 11 muestras resultaron negativas y 39 positivas.

- **Sensibilidad diagnóstica: 78,0 % (39/50)**

De las 11 muestras no positivas, 7 habían dado resultado positivo al análisis patrón de referencia de inmunofluorescencia indirecta con patrón P-ANCA, y 4 habían resultado negativos a ese mismo análisis (una de las muestras mostraba un patrón atípico).

Según los resultados de especificidad y sensibilidad diagnósticas, **el acuerdo diagnóstico es del 91,6 % (305/333)**.

## 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 PR3* 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-PR3 IgG) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anti-PR3 IgG negativo (N2) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 3,0 UA/ml y de 2,1 a 4,4 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	23,0	0,80	3,5
	2	28,5	0,86	3,0
P2	1	70,0	1,83	2,6
	2	80,0	1,68	2,1
P3	1	110,2	3,74	3,4
	2	145,8	2,93	2,0
P4	1	386,7	6,64	1,7
	2	434,6	8,78	2,0

La **reproducibilidad** se calculó analizando los resultados de la determinación de cinco sueros (uno negativo y cuatro positivos con diferentes concentraciones de anti-PR3 IgG) efectuada una sola vez con dos lotes diferentes de reactivos en 30 sesiones diferentes.

La concentración del suero anti-PR3 IgG negativo (N2) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 3,8 UA/ml.

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

Muestra	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
P1	24,5	1,56	6,4
P2	71,3	3,09	4,3
P3	124,6	11,05	8,9
P4	391,8	22,87	5,8

#### Linealidad de las diluciones

La linealidad de las diluciones del kit *ZENIT RA PR3* 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-PR3, 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	377,4	-	(100)
	2	186,7	188,7	98,9
	4	84,7	94,4	89,7
	8	37,0	47,2	78,4
2	1	957,1	-	(100)
	2	493,1	478,6	103,0
	4	256,1	239,3	107,1
	8	131,8	119,6	110,2
	16	71,0	59,8	118,7
3	1	206,9	-	(100)
	2	111,6	103,5	107,8
	4	64,0	51,7	123,8
	8	33,4	25,9	129,0

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 PR3*, 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<sub>s</sub>* la desviación estándar

estimada de la distribución de la muestra de baja concentración, y  $C_{\beta}$  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 PR3* resultó equivalente a 7,3 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 24 muestras, todas con niveles altos de otros autoanticuerpos y negativas a anti-PR3 IgG.

Las muestras utilizadas se dividían de la siguiente manera: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (2), Cenp B (2), histones (1), nucleolares (1),  $\beta_2$ -GPI/CL IgG (2) y gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (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 pueden dar niveles aparentes de analito bajo (efecto *hook*).

El método utilizado en el kit *ZENIT RA PR3*, 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-PR3 confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 20.831 UA/ml.

#### Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anti-PR3 IgG se determinó analizando 230 muestras tanto con el *ZENIT RA MPO* como con un ensayo ELISA disponible en comercio. De dichas muestras, 50 eran de pacientes afectos de vasculitis primitiva sistémica asociada a ANCA diagnosticada como granulomatosis de Wegener; 43 eran de pacientes afectos de vasculitis primitiva sistémica asociada a ANCA diagnosticada como poliangiitis microscópica; 103 muestras eran de pacientes con diferentes patologías (enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, lupus eritematoso sistémico, conectivitis sistémicas, vasculitis no asociadas a ANCA, artritis reumatoide, patologías infecciosas) y 30 de pacientes normales.

En 4 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis *ZENIT RA* y el ensayo ELISA disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 98,2 % (222/226).

La **sensibilidad relativa** resultó del 97,8 % (45/46).

La **especificidad relativa** resultó del 98,3 % (177/180).

La muestra negativa con el kit *ZENIT RA PR3* pero positiva con el kit ELISA pertenecía al grupo de muestras con lupus eritematoso sistémico.

De las tres muestras positivas con el kit *ZENIT RA PR3* pero negativas con el kit ELISA, dos pertenecían al grupo de muestras con granulomatosis de Wegener y una al grupo de muestras con poliangiitis microscópica.

#### Sueros de referencia

La cantidad de anticuerpos anti-PR3 IgG presentes en la muestra "PR3-ANCA HUMAN REFERENCE SERUM # 16 (CDC, N° Cat. IS2721, lote n° 07-0002) analizada con el kit *ZENIT RA PR3*, después de la conveniente dilución, resultó de 2282 UA/ml.

#### BIBLIOGRAFIA

---

1. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97 ( Suppl 6 ) : S12-S13, 1989.
2. Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases : a review. Am J Kidney Dis 1990; 15 : 517-29.
3. Chen M, Kallenberg CGM. New advantages in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Clin Exp Rheumatol 2009, 27( s.52 ): 108-14. Review.
4. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. Am J Clin Pathol 1999; 111: 507-13.
5. Sinico RA, Radice A, Pozzi C, et al. Diagnostic significance and antigen specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in renal disease : a prospective multicentre study. Nephrol Dial Transplant 1994; 9 : 505-10.
6. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies ( ANCA ). Autoimmunity 2005;38: 93-103.

7. Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis : sensitivity,specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994 ; 55: 34-9.
8. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, et al. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Ann Int Med* 1997; 126: 866-73.
9. Hagen EC, Daha MR, Andrassy K, Csernok E, et al for the EC/BRC Project for ANCA Assay Standardization. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Unt* 1998; 53: 743-53.
10. Sinico RA, Radice A, Tonutti E, Villalta D, et al per il gruppo FIRMA. Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ( ANCA ). *Riv Med Lab-JLM* 2002; 3 (4): 20-24.
11. Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies ( ANCA ). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies: quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-18.
12. Jennette JC,Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predicting value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53: 796-8.
13. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical Applications of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Testing. *Curr Opin Rheumatol* 2004 ; 16(1): 9-17.
14. Sinico RA, Radice A, Corace C, Di Toma L, Sabadini E. Value of a New Automated Fluorescence Immunoassay ( ELIA ) for PR3 and MPO-ANCA in Monitoring Disease Activity in ANCA-Associated Systemic Vasculitis. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050: 185-92.
15. Mandl LA, Solomon DH, Smith EL, Lew RA, Katz JN, Shmerling RH. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis : can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy ? *Arch Inter Med* 2002; 162:1509-14.
16. Radice A, Sinico RA. La diagnosi clinica e di laboratorio delle malattie autoimmune sistemiche: le vasculiti.In: *Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni*, R Tozzoli, N Bizzaro, D Villalta, E Tonutti, Ed. Aesculapio 2007.



**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](http://www.menarinidiag.es)