




	<b>ZENIT RA Scl-70</b>	Distribuido por 
<b>INSTRUCCIONES DE USO</b>	   50	

## USO PREVISTO

El ensayo *ZENIT RA Scl-70* es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa, mediante el instrumento *ZENIT RA Analyser*, de los anticuerpos específicos de clase IgG contra el antígeno Scl-70 (topoisomerasas de ADN tipo I) en muestras de suero o plasma humano (EDTA). Este ensayo se utiliza como auxilio diagnóstico en la evaluación de las enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas.

**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 autoanticuerpos anti-antígenos nucleares extraíbles (ENA) son una nutrida familia de autoanticuerpos no órgano específicos ni especie específicos, cuya detección es de gran importancia en el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas<sup>(1,2,3,4)</sup>.

Desde el punto de vista de laboratorio, las enfermedades autoinmunes sistémicas se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos antinúcleo (ANA). Los ANA son el primer análisis de autoanticuerpos que se pide para el paciente en que se sospecha una patología autoinmune sistémica. Los ANA se investigan, por lo general, con el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en un sustrato de células HEp-2; el resultado positivo de ANA con el método IFI indica la presencia de autoanticuerpos contra varios antígenos nucleares (ADN, histones, proteínas no histónicas, antígenos nucleolares, etc.) o citoplasmáticos<sup>(5,6)</sup>. Ante un resultado ANA positivo con título significativo, se han de investigar también los autoanticuerpos anti-ENA y anti-dsDNA. La coincidencia de positividad a ANA y de una (o más de una) especificidad para anti-ENA o anti-dsDNA sugiere con fuerza la presencia de patologías autoinmunes sistémicas: lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjogren (SS), esclerosis sistémica progresiva (ESP), dermatomiositis-polimiositis (DM/PM) y enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).

Los anticuerpos anti-topoisomerasa I o anti-Scl70 representan, junto con los anti-centrómero (ACA) y los anti-ARN polimerasa III (RNAP), los autoanticuerpos que se detectan con mayor frecuencia en el suero de pacientes con esclerosis sistémica (SSc)<sup>(7,8,9,10)</sup>. La SSc reconoce dos formas: una localizada (lcSSc) y una sistémica (dcSSc)<sup>(11,12)</sup>. Los anticuerpos anti-Scl70 se asocian más frecuentemente a la dcSSc.

La topoisomerasa I es una enzima que tiene por función modificar la superestructura del ADN nativo; es también un polipéptido de 765 AA localizado en el nucleoplasma, el nucleolo y los cromosomas<sup>(13)</sup>. En la

molécula se han hallado por lo menos 6 epítomos inmunodominantes: de éstos, la mayor parte de los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes reconoce dos<sup>(14)</sup>.

Los anti-Scl70 están formados por IgG de todas las subclases<sup>(15)</sup>, IgA y, con menor frecuencia, IgM<sup>(16)</sup>; se encuentran en el 20-40% de los pacientes con SSc. La asociación entre dcSSc, la presencia de anti-Scl70 y DRB1\*11 representa un factor de riesgo alto para el compromiso pulmonar en la enfermedad<sup>(17)</sup>. La prognosis de los pacientes con anti-Scl70 es más grave, porque frecuentemente al compromiso pulmonar se asocia una insuficiencia cardíaca secundaria<sup>(18)</sup>. La especificidad de estos autoanticuerpos se acerca al 100% y asume un papel fundamental en el diagnóstico de SSc.

## PRINCIPIO DEL MÉTODO

---

El kit *ZENIT RA Scl-70* para la determinación cuantitativa de las IgG específicas anti-Scl-70 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-Scl-70 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 Scl-70 en tampón fosfato que contiene proteínas estabilizadoras, Pro-Clin 300 y azida de sodio (< 0,1 %) como conservantes.

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

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humanas 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-Scl-70 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 elevada concentración de anticuerpos anti-Scl-70 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 *<br>Paquete de 960 cubetas.  | Cód. nº 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid *<br>1 botella de 0,5 litro de solución 10x.   | Cód. nº 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution *<br>1 botella de 0,5 litro de solución 20x.   | Cód. nº 41407 |
| - ZENIT RA Trigger Set *<br>1 frasco de 250 ml de Trigger A (solución de preactivación)<br>1 frasco de 250 ml de Trigger B (solución de activación) | Cód. nº 41403 |
| - ZENIT RA D-SORB Solution<br>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<br>300 tapones superiores para cerrar los envases de calibradores después de usarlos por primera vez.                        | Cód. nº 41566 |

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

Otros reactivos aconsejados

- |  |               |
|--|---------------|
| ZENIT RA ANA CONTROL SET   | Cód. nº 41448 |
| 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano negativo y 3 ampollas de 1,5 ml de suero humano positivo a anticuerpos anti-Scl-70. |               |

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos del kit *ZENIT RA Scl-70* 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).

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).

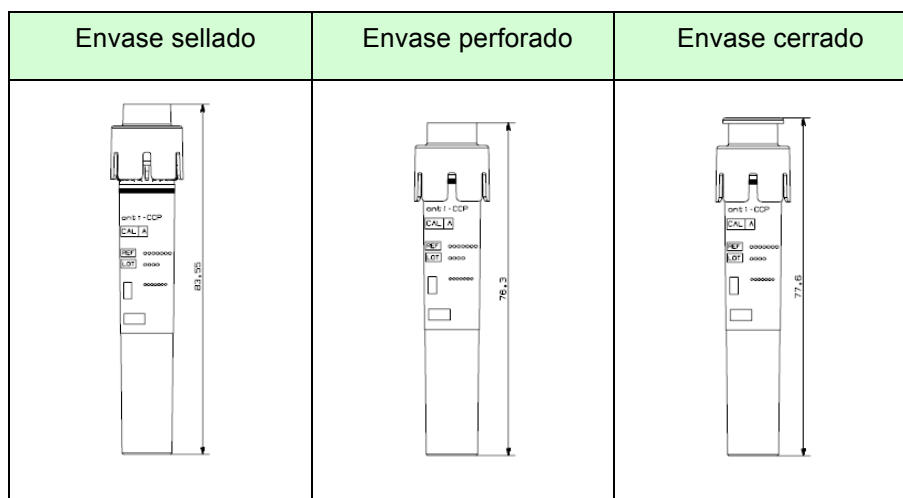
Introducir en el instrumento los calibradores o controles en el área específica del instrumento, después de leer el código de barras. Si la etiqueta estuviera dañada, o si la misma no fuera leída, los datos del código de barras se pueden introducir manualmente.

Los valores de concentración de anticuerpos IgG anti-Scl-70 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 Scl-70* 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 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-Scl-70 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-Scl-70 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 Scl-70* son 0,0 – 640 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 640 UA/ml se pueden indicar como "superiores a 640 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 considera negativa a la presencia de IgG anti-Scl-70
≥ 10	La muestra se considera positiva a la presencia de IgG anti-Scl-70

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 Scl-70* 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 Scl-70*.

---

## VALORES ESPERADOS

---

Se analizaron las muestras de 100 donantes seleccionados al azar para verificar la presencia de anticuerpos IgG anti-Scl-70.

99 muestras resultaron negativas, con un valor promedio de 1,1 UA/ml y una desviación estándar de 0,84 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 2,7 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 Scl-70* 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 cuatro sueros (uno negativo y tres positivos con diferentes concentraciones de anti-Scl-70 IgG) efectuadas con dos lotes diferentes de reactivos durante una misma sesión de análisis.

La concentración del suero anti-Scl-70 IgG negativo (NC) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 0,6 UA/ml y de 0,2 a 0,8 UA/ml respectivamente con los lotes de reactivos nº 1 y 2.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 3 sueros positivos.

Muestra	Nº de lote de reactivos	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
LP	1	18,0	0,52	2,9
	2	16,4	0,57	3,5
MP	1	76,0	3,39	4,5
	2	77,2	7,34	9,5
HP	1	222,2	9,09	4,1
	2	231,5	8,00	3,5

La **reproducibilidad** se calculó analizando los resultados de la determinación de cuatro sueros (uno negativo y tres positivos con diferentes concentraciones de anti-Scl-70 IgG) efectuada una sola vez con dos lotes diferentes de reactivos en 30 sesiones diferentes.

La concentración del suero anti-Scl-70 IgG negativo (N1) estuvo comprendida en el intervalo de 0,0 a 0,6 UA/ml.

En la tabla se indican los resultados obtenidos con los 3 sueros positivos.

Muestra	Concentración media (UA/ml)	DE	CV %
P1	17,4	1,06	6,1
P2	77,9	5,57	7,2
P3	211,6	18,44	8,7

#### Linealidad de las diluciones

La linealidad de las diluciones del kit *ZENIT RA Scl-70* 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 2 sueros con concentración elevada de IgG anti-Scl-70, 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	197,7	-	(100)
	2	100,2	98,9	101,3
	4	49,0	49,4	99,2
	8	22,6	24,7	91,5
2	1	148,3	-	(100)
	2	72,6	74,2	97,8
	4	35,1	37,1	94,6
	8	17,6	18,5	95,1

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 Scl-70*, 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<sub>β</sub>* 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 Scl-70* resultó equivalente a 5,0 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 13 muestras, todas con niveles elevados de otros autoanticuerpos y negativas a anti-Scl-70 IgG.

Las muestras utilizadas se dividían de la siguiente manera: dsDNA (1), Cenp B (2), histones (1), nucleolares (1),  $\beta_2$ -GPI/CL IgG (1), Gliadina/t-TG (3), RF (2), MPO (1) y 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 elevadas

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

El método utilizado en el kit *ZENIT RA Scl-70*, 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-Scl-70 confirmó la ausencia de efecto *hook* hasta una concentración de 3.010 UA/ml.

Sensibilidad y especificidad relativas

La presencia de anticuerpos anti-Scl-70 IgG se determinó analizando 422 muestras tanto con el análisis *ZENIT RA Scl-70* como con un ensayo ELISA disponible en comercio. En 2 de las muestras, los resultados fueron discordantes entre el análisis *ZENIT RA* y el ensayo ELISA disponible en comercio.

La **concordancia relativa** resultó del 99,5 % (420/422).

La **sensibilidad relativa** resultó del 100,0 % (23/23).

La **especificidad relativa** resultó del 99,5 % (397/399).

Suero de referencia

La cantidad de anticuerpos anti-Scl-70 IgG presentes en la muestra "ANA HUMAN REFERENCE SERUM # 9" (CDC, N° Cat. IS2135, lote n° 84-0027) analizada con el kit *ZENIT RA Scl-70* resultó de 405 UA/ml.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CA von Mühlen, EM Tan. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Sem Arthr Rheum* 1995; 24: 323-58.
2. RL Humbel. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie. In : Humbel RL, ed. *Autoanticorps et maladies autoimmunes*, Paris, France : Edition Scientifiques Elsevier; 1997: 17-20.
3. PN Hollingsworth, SC Pummer, RL Dawkins. Antinuclear antibodies. In : Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands : Elsevier Science BV; 1996: 74-90.
4. CA Slater, RB Davis, RH Shmerling. Antinuclear antibodies testing. A study of clinical utility. *Arch Int Med* 1996; 156: 1421-5.
5. RL Humbel. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In : van Venrooij, Maini RN eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, the Netherlands : Kluwer; 1993: A2:1-16.
6. National Committee for clinical Laboratory Standarditation. Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen ( IF-ANA ). Approved guideline. Wayne, PA: NCCLS I/LA2-A, vol 16( 11 ); 1996.
7. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis ( scleroderma ). *Arthritis Rheum* 1980; 23 : 581-90.
8. HJ Lakomek, HH Guldner, FA Bautz, G Goerz, P Kind, M Mensing, et al. Nuclear antibodies as serologic markers in progressive systemic scleroderma. *Hautarzt* 1987; 38: 63-9.
9. CC Bunn, CP Denton, X Shi-Wen, C Knight, CM Black. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 15-20.
10. D Vazquez-Abad, NF Rothfield. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 145-57.
11. EC Le Roy, T Krieg, C Black, TA Jr Medsger, R Fleischmajer, N Rowell, et al. Scleroderma ( Systemic Sclerosis ) : classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15 : 202-5.
12. RL Humbel. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie auto-immunes. In : Humbel RL, ed. *Autoanticorps et maladies autoimmunes*, Paris: Elsevier 1997. pp 71-3.
13. P D'Arpa, PS Machlin, H Ratie, NF Rothfield, DW Cleveland, WC Earnshaw. cDNA cloning of human topoisomerase I. Catalytic activity of a 67.7 kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988.; 85: 2543-7.

14. P D'Arpa, H White-Cooper, DW Cleveland, NF Rothfield, WC Earnshaw. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I ( Scl-70 ) recognized by sera of scleroderma patients. Arthritis Rheum 1990; 33: 1501-11.
15. C Bona, N Rothfield. Autoantibodies in scleroderma and tightskin mice. Curr Opin immunol 1994; 6: 931-7.
16. D Vazquez-Abad,CA Russell, SM Cusick, WC Earnshaw, NF Rothfield. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase I isotypes. Clin Immunol Immunopathol 1995; 74: 257-70.
17. GC Fanning, KI Welsh, C Bunn, A Du Bois, CM Block. HLA association in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. Br J Rheumatol 1998; 37: 201-7.
18. D Basu, JD Reveille. Anti-Scl-70. Autoimmunity 2005; 38: 65-72.



**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)