

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG contra la mieloperoxidasa y/o proteinasa-3 en suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para ayudar en el diagnóstico de vasculitis autoinmune caracterizada por concentraciones elevadas de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA). Los MPO y/o PR-3 se pueden asociar con trastornos autoinmunes como la granulomatosis de Wegener, GNFSI, PAM y SPR. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Los anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) fueron descritos inicialmente por Davies y cols. en 1982 (1). Desde este descubrimiento inicial, se ha encontrado que los ANCA se asocian con varias vasculitis sistémicas (VS). En la actualidad, se sabe que los ANCA incluyen dos especificidades principales: c-ANCA, dirigidos contra la proteinasa-3 (PR-3) y p-ANCA, dirigidos contra la mieloperoxidasa (MPO). El análisis de p-ANCA y c-ANCA es muy recomendable en el estudio diagnóstico de pacientes que acuden con un cuadro clínico que sugiere VS. Los síndromes clínicos que se asocian con mayor frecuencia con la presencia de ANCA, son los siguientes:

- Granulomatosis de Wegener (2)
- Poliarteritis (3)
- Vasculitis de superposición (4)
- Glomerulonefritis idiopática en semilunas (GNFSI) (5)
- Enfermedad de Kawasaki (6)

Aunque la identificación inicial de c-ANCA y p-ANCA se basó en la inmunofluorescencia indirecta, la mejor identificación y purificación de PR-3 y MPO ha dado lugar al desarrollo de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para ambos marcadores.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra MPO y/o PR-3 en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con una mezcla antígenos MPO y PR-3. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

- Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
- Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuban la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
- Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con una mezcla de las enzimas MPO y PR-3 (antígenos). Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Fc) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL SPE	6.	Diluyente SAVE Diluent®: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN TMB	7.	TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN STOP	8.	Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF 10X	9.	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVE Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
- El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

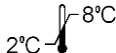
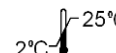
- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
- Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.

4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (9).
5. Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente SAVE Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
8. La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
15. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
22. Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVE Diluent® sin abrir
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

1. ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
2. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
3. Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (7, 8). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
4. Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8 °C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a

-20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (10).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
2. Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

3. Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVE Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVE Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
4. A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
5. Añada 100 µl de diluyente SAVE Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - a. **Procedimiento de lavado manual:**
 1. Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 2. Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 3. Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 4. Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - b. **Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
8. Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
9. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3.  Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6.  Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9.  Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

Intervalo de DO

Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
- b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.

- c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- a. **Factor de corrección:** El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. **Límite de referencia de la DO:** Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
($FC \times \text{media de DO del calibrador} = \text{límite de referencia de la DO}$)
- c. **Valores índice/cocientes de DO:** Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo:	DO media del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Límite de referencia de la DO	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	$0,432/0,198 = 2,18$

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	Valor índice/cociente de DO
Muestras negativas	$\leq 0,90$
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	$\geq 1,10$

- a. Un cociente de DO $\leq 0,90$ indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos contra MPO o PR-3
- b. Un cociente de DO $\geq 1,10$ indica que se han detectado anticuerpos específicos contra MPO y/o PR-3. Los resultados de este sistema de pruebas son cualitativos y los valores del cociente en el intervalo reactivo no son indicativos de la cantidad de anticuerpos presentes.
- c. Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la prueba de las muestras dudosas utilizando un procedimiento serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados del sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS. Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
2. Las características de funcionamiento de este dispositivo no están establecidas en muestras lipémicas, hemolizadas e ictericas, por lo que no deben utilizarse este tipo de muestras con esta prueba.
3. Aunque el sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS detectará anticuerpos frente a MPO y PR-3 simultáneamente, el método no permite diferenciar entre ambos. Las muestras con resultado positivo mediante ANCA Screen se deben estudiar con los sistema de pruebas ELISA individuales de MPO y PR-3 de ZEUS para determinar cuál es el anticuerpo presente.
4. Los resultados de este método no son una prueba diagnóstica de la presencia o ausencia de enfermedad. No inicie el tratamiento inmunosupresor exclusivamente sobre la base de un resultado positivo.

RESULTADOS ESPERADOS

Se ha llevado a cabo un estudio en el que se evaluó la presencia de autoanticuerpos ANCA en 90 sueros de donantes normales procedentes del nordeste de los Estados Unidos. De los 90 sueros estudiados, uno (1,1%) fue positivo y uno (1,1%) fue dudoso. En otro estudio con 105 muestras enviadas a un laboratorio de referencia del nordeste de los Estados Unidos, catorce (14/105= 13,3%) fueron positivas para anticuerpos ANCA. En conjunto, estos estudios demuestran que la incidencia de ANCA es relativamente poco frecuente.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo:

Se ha realizado un estudio comparativo interno para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS con otro sistema de pruebas ANCA IgG ELISA comercializado usando 316 muestras: 196 muestras de enfermos, 113 muestras enviadas a un laboratorio de referencia en el nordeste de los Estados Unidos para serología sistemática de ANCA y 7 muestras que se habían estudiado previamente y que eran reactivas para ANCA. Los resultados de la investigación se resumen en las Tablas 1 y 2 siguientes.

Tabla 1: Resumen de las muestras clínicas

n	Varones	Mujeres	Edad			Comentarios
			Alta	Baja	Media	
45	18	27	82	14	54,7	Categoría de la enfermedad: Granulomatosis de Wegener
41	21	20	100	22	63,2	Categoría de la enfermedad: Glomerulonefritis idiopática necrotizante y con semilunas
41	16	25	87	20	63,1	Categoría de la enfermedad: Poliarteritis microscópica
39	17	22	94	11	60,8	Categoría de la enfermedad: Síndrome pulmonar renal
30	15	15	78	3	43,4	Controles de enfermedad por vasculitis o glomerulonefritis, vasculitis no relacionadas con ANCA.
7	Información no disponible					ANCA positivos estudiados previamente, sin diagnóstico disponible
113	Información no disponible					Muestras enviadas a un laboratorio de referencia para serología sistemática de ANCA

Tabla 2: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia

		Sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS			
Kit ELISA ANCA comercial	Positivo	Positivo	Negativo	Dudoso*	Total
	Negativo	148	8	0	156
	Dudoso*	3	113	4	120
	Total	15	22	3	40
		166	143	7	316

* Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos.

Sensibilidad relativa = $148/156 = 94,9\%$

Especificidad relativa = $113/116 = 97,4\%$

Concordancia relativa = $261/272 = 96,0\%$

Intervalo de confianza de 95%** = de 91,4 a 98,3%

Intervalo de confianza de 95%** = de 94,5 a 100%

Intervalo de confianza de 95%** = de 93,6 a 98,3%

** Los intervalos de confianza de 95% se calcularon según el método exacto.

2. Precisión y reproducibilidad:

Para evaluar la reproducibilidad intraensayo e interensayos, se analizaron 6 muestras distintas. El análisis de cada una de las muestras se repitió ocho veces cada día durante tres días. Los resultados se utilizaron para calcular valores medios en unidades, desviaciones típicas y porcentaje de coeficiente de variación (CV). Dos de las muestras fueron positivas fuertes, dos fueron claramente negativas y dos dieron valores cercanos al límite de referencia del ensayo. Los resultados de este estudio se resumen a continuación.

Tabla 3: Resultados de la prueba de precisión del sistema de pruebas ELISA ANCA Screen de ZEUS

Muestra	Reproducibilidad intraensayo									Reproducibilidad interensayos		
	Día 1			Día 2			Día 3			Todos los días combinados		
	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV	Media	DE	% CV
1	7,40	0,25	3,4	7,10	0,21	3,0	7,60	0,30	3,9	7,40	0,34	4,6
2	5,89	0,20	3,4	5,59	0,30	5,4	5,90	0,32	5,4	5,80	0,30	5,2
3	1,00	0,07	6,7	0,90	0,05	5,6	1,14	0,07	6,1	1,00	0,11	11,0
4	0,97	0,07	7,6	0,78	0,06	7,7	0,96	0,07	7,3	0,90	0,11	12,2
5	0,17	0,01	5,3	0,18	0,02	8,3	0,21	0,03	11,9	0,18	0,02	11,1
6	0,08	0,01	6,0	0,06	0,01	20,7	0,08	0,01	12,5	0,07	0,02	21,4

3. Reactividad cruzada:

Para examinar la posible reactividad cruzada con otros autoanticuerpos, se analizaron ocho muestras positivas en anticuerpos contra antígenos nucleares (ANA) en células HEp-2. Dos de las muestras demostraron un patrón homogéneo, dos demostraron un patrón nucleolar, dos demostraron un patrón de centrómero y dos demostraron un patrón moteado. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 4 siguiente. Los resultados de esta investigación indican que no es probable la reactividad cruzada con otros anticuerpos antinucleares.

Tabla 4: Resultados de la investigación de la reactividad cruzada.

Número de muestra	Resultados de ANA HEp-2 IFA		Resultados del ELISA ANCA Screen de ZEUS	
	Patrón	Título final	Densidad óptica	Cociente
1	Homogéneo	1:1280	0,066	0,36
2	Homogéneo	1:640	0,019	0,10
3	Moteado	1:2560	0,044	0,24
4	Nucleolar	1:1280	0,101	0,56
5	Centrómero	1:1280	0,050	0,28
6	Centrómero	1:1280	0,035	0,19
7	Moteado	1:5120	0,051	0,28
8	Nucleolar	1:10240	0,028	0,15

REFERENCIAS

- Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology. Br. J. Med. 285:606, 1982
- van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 1:425-429, 1985.
- Feehally J, Wheeler DC, Walls J, et al: A case of microscopic polyarteritis associated with antineutrophilia cytoplasmic antibodies. Clin. Nephrol. 27: 214-215, 1987
- Falk RJ, Becker M, Terrell R, Jennette JC: Antigen specificity of P-ANCA and C-ANCA (Abstract). The 3rd International Workshop on ANCA, Washington, DC 1990: 2-3.
- Jennette JC, Falk RJ: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. N.Engl.J. Med. 318: 1651-1657, 1988.
- Savage COS, Tizard J, Jayne D, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Kawasaki disease. Arch. Dis. Child. 64: 360-363, 1989.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

ZEUS ELISA y SAVE Diluent[®] son marcas registradas de ZEUS Scientific

Sistema de pruebas ANCA Screen

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS

Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail

support@zeusscientific.com.

Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

©2017 ZEUS Scientific. Todos los derechos reservados.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands