

USO PREVISTO

El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte**® Autoimmune Vasculitis (AIV) Plus de ZEUS está diseñado para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos de clase IgG en tres antígenos separados: membrana basal glomerular (GBM), mieloperoxidasa (MPO) y proteinasa 3 (PR-3) en suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para ayudar en el diagnóstico de vasculitis autoinmune caracterizada por concentraciones elevadas de anticuerpos seleccionados. Los MPO y/o PR-3 se pueden asociar con trastornos autoinmunes como la granulomatosis de Wegener, GNFSI, PAM y SPR. Los anticuerpos anti-GBM ayudan en el diagnóstico del síndrome de Goodpasture. Esta prueba está concebida exclusivamente 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 dirigido contra la PR-3, y P-ANCA dirigido contra la 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 más frecuentes asociados con ANCA son los siguientes: granulomatosis de Wegener (2), poliarteritis (3), vasculitis de superposición (4), glomerulonefritis semilunar idiopática (ICGN) (5), enfermedad de Kawasaki (6) y trastornos renales autoinmunes, como el síndrome de Goodpasture (7).

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) e inmunoensayos basados en micropartículas para ambos marcadores. El síndrome de Goodpasture se caracteriza por la hemorragia pulmonar, el fallo renal y la presencia de anticuerpos anti-GBM (8). En el síndrome de Goodpasture, una parte del dominio globular de las cadenas de colágeno IV es antigénica y responsable del desarrollo de anticuerpos anti-GBM en la glomerulonefritis progresiva (9, 10 y 11).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de la clase IgG en suero humano ante MPO, PR-3 y GBM. El procedimiento de prueba comporta dos pasos de incubación:

1. Los sueros de prueba (diluidos correctamente) se incuban en una mezcla multiplexada de la suspensión de microesferas. La suspensión de microesferas contiene una mezcla de conjuntos distinguibles de microesferas de poliestireno; cada conjunto conjugado con un antígeno diferente. Si está presente en los sueros del paciente, determinados anticuerpos se unirán con el antígeno inmovilizado en uno o más conjuntos de microesferas. Las microesferas se enjuagan para extraer las proteínas séricas no reactivas.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con ficoeritrina al recipiente y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. La suspensión de microesferas se analiza después con el instrumento **AtheNA Multi-Lyte**. El conjunto o conjunto de microesferas se clasifican (identifican) y la cantidad de molécula informante (conjugado PE) se determina para cada conjunto de microesferas. Con la *Intra-Well Calibration Technology*® (tecnología de calibración dentro del pocillo), se utilizan conjuntos de microesferas de calibración para convertir fluorescencia sin procesar en resultado (unidades).

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): suspensión de microesferas, controles, conjugado y SAVe Diluent**®.

SOLN	BEAD	1. Suspensión de microesferas: contiene microesferas de poliestireno de 5,5 micras separadas y distinguibles que se conjugan con los siguientes antígenos: mieloperoxidasa (MPO), proteinasa 3 (PR-3) y membrana basal glomerular (GBM). La suspensión de microesferas también contiene un conjunto de microesferas diseñadas para detectar anticuerpos no específicos en la muestra del paciente (si está presente) y cuatro conjuntos de microesferas separadas que se utilizan para la calibración del ensayo. Una botella ámbar que contiene 5,5 ml. Listo para usar.
CONJ		2. Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena γ) de cabra conjugada con ficoeritrina. Una botella ámbar que contiene 15 ml. Listo para usar.
CONTROL	+ 1	3. Control positivo 1 (suero humano): Un vial de 0,2 ml con tapón rojo.
CONTROL	+ 2	4. Control positivo 2 (suero humano): Un vial de 0,2 ml con tapón blanco.
CONTROL	-	5. Control negativo (suero humano): Un vial de 0,2 ml con tapón verde.
DIL	SPE	6. Diluyente SAVe Diluent®: Una botella de 50 ml con tapón verde de solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
WASHBUF	10X	7. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Una botella de 50 ml con tapón transparente de solución salina tamponada con fosfato concentrada 10x.

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** de ZEUS: **Tampón de lavado y diluyente SAVe Diluent**®.
2. El sistema de pruebas también contiene:
 - a. Una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.
 - b. CD de calibración que incluye los valores de calibración del kit específicos de los lotes y necesarios para el análisis de la muestra y el control de calidad del ensayo, así como el prospecto.
 - c. Una placa de disolución de 96 pocillos.
 - d. Una placa de filtro de 96 pocillos.

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. 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 respire los vapores. Respete todas las leyes locales, estatales y federales para la eliminación de residuos.
3. La suspensión de microesferas **AtheNA Multi-Lyte** no contiene organismos viables. No obstante, las tirillas deben considerarse como **materiales biológicos potencialmente peligrosos**, y deben manipularse como tal.
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

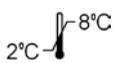
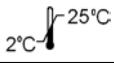
recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (20).

- 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 empezar el ensayo. Devuelva los reactivos no utilizados a una temperatura refrigerada inmediatamente después de su uso.
- 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. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente SAVe Diluent®, la suspensión de microesferas, los controles y el conjugado contienen azida sódica en una concentración de <0,1 % (p/v). Se ha informado que la azida sódica forma azidas de plomo o cobre en las cañerías del laboratorio, lo que puede ocasionar explosiones al golpear con un martillo. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- Nunca pipeteo con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Evite salpicar o generar aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación. La suspensión de microesferas y el conjugado son reactivos sensibles a la luz. Ambos se han embalado en envases que protegen de la luz. Las exposiciones normales que se experimentan durante el curso de la ejecución del ensayo no afectarán en rendimiento del ensayo. No exponga estos reactivos a fuentes potentes de luz visible de manera innecesaria.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: lejía de uso doméstico al 10 %, hipoclorito de sodio al 0,5 %). Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- 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.
- 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

- Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud 10 - 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipetas descartables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar los pasos de incubación.
- Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: lejía de uso doméstico al 10 %, hipoclorito de sodio al 0,5 %).
- Sistema **AtheNA Multi-Lyte** (instrumento Luminex®) con tampón de lavado (número de producto 40-50000).
- Agua destilada o desionizada.
- Vórtex.
- Sonicador de baño pequeño.
- Agitador de placas capaz de agitar a una velocidad de 800 RPM (opcional para el mezclador).
- Aspirador de vacío y colector de vacío para lavar las microesferas.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Suspensión de microesferas: Extraiga solo la cantidad necesaria para analizar las muestras a las que se les va a realizar la prueba y devuelva la porción no utilizada a su almacenamiento.
	Conjugado: NO CONGELAR. Sistema de pruebas, controles positivos, control negativo y diluyente SAVe Diluent® sin abrir
	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

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recogida 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).
- 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.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (13, 14). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- 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 propio laboratorio utilizar todas las referencias disponibles y/o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad de su laboratorio (15).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del lugar de almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25°C).
- Determine el número total de controles y muestras que se desean probar. Es necesario incluir el control negativo y dos controles positivos con cada tanda de pruebas. El control negativo debe probarse en el pocillo A1, el control positivo 1 en el pocillo B1 y el control positivo 2 en el pocillo C1. Cada control y muestra necesita un micropocillo para su procesamiento.
 - Para optimizar los tiempos de lectura, la suspensión de microesferas debe estar bien mezclada antes de su empleo. La manera más efectiva de volver a suspender las microesferas es en primer lugar utilizar el vórtex durante aproximadamente 30 segundos, y después sonicar durante aproximadamente 30 segundos en un sonicador de baño pequeño.

- b. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que el contenido del ensayo se mezcle detenidamente. Entre los medios adecuados de mezcla se incluye mezclar la placa en un agitador de placa durante aproximadamente 30 segundos a 800 RPM aproximadamente, o ajustar una pipeta en aproximadamente ½ del volumen en la placa y aspirar y expulsar repetidamente (bomba arriba y bomba abajo) el contenido del pocillo durante un mínimo de 5 ciclos.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Control negativo	etc.
B	Control positivo 1	
C	Control positivo 2	
D	Paciente 1	
E	Paciente 2	
F	Paciente 3	
G	Paciente 4	
H	Paciente 5	

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10µL de suero + 200µL de diluyente SAvE Diluent®) del control negativo, 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.** Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que las disoluciones de la muestra se mezclen detenidamente conforme al punto 2b de arriba.
- Después de determinar el número total de pocillos a procesar, utilice una pipeta multicanal o repetidora para dispensar 50 µL de suspensión de microesferas dentro de cada uno de los pocillos de la placa de filtración.
- Transfiera 10 µL de cada muestra diluida (1:21) y el control de la placa de disolución a la placa de filtración. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que la disolución de muestra y la suspensión de microesferas se mezclen detenidamente conforme al punto 2b de arriba.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante 30 ± 10 minutos.
- Después de la incubación, enjuague las microesferas mediante filtrado al vacío usando el tampón de lavado que se suministra diluido en la concentración 1x.
 - Coloque la placa de filtración sobre el colector de vacío y extraiga la solución, dejando las microesferas detrás.
 - Apague el vacío y añada 200 µL de tampón de lavado.
 - Aplique el vacío y extraiga la solución.
 - Repita los pasos 7b y 7c para un total de tres enjuagues.
- A continuación del lavado final, secar suavemente el fondo de la placa y permitir que la placa se seque al aire durante 3-5 minutos antes de continuar con el siguiente paso.
- Agregue 150 µL de conjugado a cada micropocillo en el mismo orden en que se agregaron las muestras. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que el conjugado y la suspensión de microesferas se mezclen detenidamente conforme al punto 2b de arriba. Mientras mezcla el conjugado tiene la opción de transferir la mezcla a pocillos vacíos de una placa de reacción de poliestireno.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante 30 ± 10 minutos.
- Ajuste el instrumento **AtheNA Multi-Lyte** para analizar las reacciones. Para ello, seleccione la plantilla AIV Plus. Consulte el manual del operador para obtener detalles relacionados con el funcionamiento del instrumento **AtheNA Multi-Lyte**. Los resultados se pueden leer en la placa del filtro o en una placa de reacción. **NOTA: Para obtener un análisis adecuado de la muestra, es importante que el instrumento se instale, calibre y mantenga de acuerdo con las instrucciones del fabricante.** Consulte el manual del instrumento para obtener información sobre la preparación del instrumento antes de leer los resultados del ensayo.
- Tras finalizar la incubación del conjugado tiene 60 minutos para leer la placa. Tiene la opción de agitar la placa durante unos 15 segundos antes de la lectura. Este paso opcional puede reducir la cantidad de tiempo necesario para leer la placa

Paso	Procedimiento de prueba abreviado
1	Diluya las muestras al 1:21 en diluyente SAvE Diluent®. Mezcle bien.
2	Combine 50 µL de suspensión de microesferas y 10 µL de muestra diluida en un pocillo vacío. Mezcle bien.
3	Incuba a temperatura ambiente durante 30 ± 10 minutos.
4	Enjuague las microesferas 3 veces con 200 µL de tampón de lavado (1x).
5	Seque suavemente el fondo de la placa y secar con aire durante 3-5 minutos.
6	Agregue 150 µL de conjugado en cada pocillo. Mezcle bien.
7	Transfíerolo a una placa de reacción (opcional).
8	Incuba a temperatura ambiente durante 30 ± 10 minutos.
9	Agite la placa (opcional).
10	Lea los resultados en un periodo de 60 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

- Cada vez que se realiza el ensayo, es necesario incluir el control negativo (en el pocillo A1) y los dos controles positivos (en los pocillos B1 hasta el C1).
- La validez de la tirada se determina mediante la realización de los controles positivos y negativos. Estos criterios se analizan automáticamente con la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*.
 - El control negativo y los dos controles positivos deben ser todos negativos en la microesfera no específica o de antígeno de control.
 - El control negativo debe ser negativo para cada uno y todos los analitos incluidos en la suspensión de microesferas.
 - Cada control positivo debe ser positivo para un determinado grupo de analitos que se incluyen en la suspensión de microesferas. Estos intervalos están codificados dentro del CD de calibración.
 - Si no se cumple ninguno de los criterios anteriores, toda la tirada se considerará como no válida y se tendrá que repetir.
- La validez de la muestra se basa en las características de las microesferas y sus interacciones con los sueros de los pacientes. Hay varios parámetros que se supervisan automáticamente con la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*. Si se determina que cualquiera de los criterios no cumple las especificaciones, los resultados del paciente se considerarán como no válidos y deberán repetirse. En caso de que esto se produzca, el informe de datos indicará la muestra en particular que se invalidó y el código de solución de problemas.
- Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas. Los controles externos deben ser representativos del suero humano normal debido a que el sistema de calibración de **AtheNA Multi-Lyte** se basa parcialmente en las características de la muestra de suero. Si la formulación de la muestra es artificial (no es suero humano), se pueden producir resultados erróneos.
- Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurements (Control de calidad estadístico para determinaciones cuantitativas) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Cálculos**
 - Calibración del ensayo: El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS utiliza la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*. La tecnología *Intra-Well Calibration Technology* incluye una curva estándar con múltiples puntos dentro de la suspensión de microesferas. Con la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*, cada pocillo del ensayo se calibra de manera interna sin que intervenga ningún usuario. La curva estándar está diseñada para que

se ajuste automáticamente basándose en las características únicas del paciente o suero de control. Los valores del calibrador se asignan de acuerdo con los estándares internos de ZEUS, que son específicos del lote y están codificados en el CD de calibración del lote.

- b. Límite de referencia analitos: Cada analito del sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS tiene un límite de referencia asignado. ZEUS determina los límites de referencia para cada lote de sistema de pruebas, y están codificados en el CD de calibración del lote.
- c. Con la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*, todos los cálculos se realizan automáticamente cuando se utiliza el sistema **AtheNA Multi-Lyte**. La tecnología *Intra-Well Calibration Technology* ejecuta un análisis de regresión de las normativas internas, y a continuación ajusta los valores de unidad calculados basándose en una normativa adicional y en las características de la muestra de suero.

2. **Interpretaciones:** Los valores unitarios de las muestras de GBM, MPO y PR-3 se interpretan como sigue:

Muestras negativas	< 100 AU/mL
Muestras positivas	> 120 AU/mL
Muestras dudosas	100 – 120 AU/mL

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS es una herramienta para el diagnóstico, pero no es en sí una prueba diagnóstica. Los resultados de la prueba se deben interpretar junto con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos diagnósticos.
2. Las muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas pueden interferir en el resultado de este ensayo. Además, las muestras con concentraciones de IgC anormales pueden interferir en el resultado de este ensayo. Debe evitarse el uso de estos tipos de muestras.

RESULTADOS ESPERADOS

1. MPO/PR-3

La investigación clínica incluyó 122 muestras que se enviaron al laboratorio para una prueba ANCA de rutina, 173 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y 150 muestras de donantes de sangre normales. Los resultados de MPO y PR-3 se usaron para demostrar el resultado esperado para tales grupos. Los resultados de cada población se ilustran en las Tablas 1 a 2 siguientes:

Tabla 1: Resultado esperado de los resultados de analitos MPO y PR-3 utilizando diferentes poblaciones de muestra

Grupo	N	Analito		Resultado AtheNA Multi-Lyte			
				Inválido	Dudoso	Positivo	Negativo
Rutina	122	MPO	Cantidad	2	2	21	97
			%	1,6	1,6	17,2	79,5
		PR-3	Cantidad	2	2	50	68
			%	1,6	1,6	41,0	55,7
Clínicos	173	MPO	Cantidad	1	2	104	66
			%	0,6	1,2	60,1	38,2
		PR-3	Cantidad	1	6	104	62
			%	0,6	3,5	60,1	35,8
Normal	150	MPO	Cantidad	0	1	9	140
			%	0,0	0,7	6,0	93,3
		PR-3	Cantidad	0	6	27	117
			%	0,0	4,0	18,0	78,0

Tabla 2: Resultado esperado de los resultados de analitos MPO y PR-3 utilizando diferentes poblaciones de muestra

Grupo	Analito	Resultados AtheNA Multi-Lyte			
		Resultado promedio	Resultado medio	Intervalo	
				Valor bajo	Resultado alto
Rutina	MPO	211,6	35,5	0	1887
	PR-3	396,3	73	5	3405
Clínicos	MPO	272	50	14	2451
	PR-3	267,2	62	18	3041
Normal	MPO	53	35	0	684
	PR-3	128	57	0	1636

2. GBM

La investigación clínica incluyó 115 muestras que se enviaron a un laboratorio para una prueba ANCA (vasculitis sistémica) y 115 muestras que se entregaron para una prueba GBM (síndrome de Goodpasture). Los datos resultantes se usaron para demostrar el resultado esperado para tales grupos.

Tabla 3: Resultado esperado de los analitos ANCA y GBM utilizando diferentes poblaciones de muestra

N	Analito		Resultado AtheNA Multi-Lyte			
			Inválido	Dudoso	Positivo	Negativo
115	ANCA	Cantidad	0	0	20	95
		%	1,6	1,6	17,4	82,6
	GBM	Cantidad	0	0	13	102
		%	0,00	0,00	11,3	88,7

Tabla 4: Resultado esperado de los analitos ANCA y GBM utilizando diferentes poblaciones de muestra

Analito	Resultado promedio	Resultado medio	Intervalo	
			Valor bajo	Resultado alto
			ANCA	105
GBM	85	39	13	1336

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se ha realizado un estudio comparativo interno para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS con el sistema de pruebas ELISA comercializado. El rendimiento se evaluó usando 445 muestras: 150 de sueros de donantes normales, 122 muestras enviadas previamente a un laboratorio para una prueba de autoanticuerpos ANCA rutinaria, y 173 muestras de personas enfermas de pacientes diagnosticados clínicamente con trastornos SV. Los resultados de la investigación se resumen en las tablas 5 y 6 siguientes. Los datos comparativos de GBM, obtenidos a partir de 230 muestras (incluyendo 115 sueros de pacientes que podrían tener el síndrome de Goodpasture), se muestran en la tabla 7.

Tabla 5: Rendimiento del sistema de pruebas AtheNA Multi-Lyte AIV Plus de ZEUS (analito MPO) en comparación con el sistema de pruebas ELISA MPO IgG de ZEUS

		Resultado de ELISA			
		Positivo	Negativo	Dudoso*	Total
AtheNA Multi-Lyte Resultados	Positivo	55	39	2	96
	Negativo	2	338	1	341
	Dudoso*	1	4	0	5
	Total	59	383	3	445
Sensibilidad relativa = 55/57 = 96,5 %.		Especificidad relativa = 338/377 = 89,6 %.		Concordancia relativa = 393/434 = 90,6%	

* Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos de concordancia.

Tabla 6: Rendimiento del sistema de pruebas AtheNA Multi-Lyte AIV Plus de ZEUS (analito PR-3) en comparación con el sistema de pruebas ELISA PR-3 IgG de ZEUS

		Resultado de ELISA			
		Positivo	Negativo	Dudoso*	Total
AtheNA Multi-Lyte Resultados	Positivo	85	53	1	139
	Negativo	6	283	0	289
	Dudoso*	4	10	0	14
	Total	96	348	1	445
Sensibilidad relativa = 85/91 = 93,4%.		Especificidad relativa = 283/336 = 84,2%.		Concordancia relativa = 368/427 = 86,2%	

* Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos de concordancia.

Tabla 7: Rendimiento del sistema de pruebas AtheNA Multi-Lyte AIV Plus de ZEUS (analito GBM) en comparación con el sistema de pruebas ELISA ANCA de ZEUS

		Resultado de ELISA			
		Positivo	Negativo	Dudoso*	Total
AtheNA Multi-Lyte Resultados	Positivo	31	2	0	33
	Negativo	1	195	1	197
	Dudoso*	0	0	0	0
	Total	32	197	1	230
Porcentaje de concordancia positivo = 31/33 = 93,9 %		Porcentaje de concordancia negativo = 195/197 = 99,0 %		Porcentaje de concordancia general = 226/230 = 98,3 %	

* Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos de concordancia.

Tabla 8: Resumen del rendimiento comparado

Analito	N	Sensibilidad relativa	Especificidad relativa	Concordancia general
MPO	445	55/57 = 96,5%	338/377 = 89,6%	393/439 = 90,6%
PR-3	445	85/91 = 93,4%	283/336 = 84,2%	368/427 = 86,2%
GBM	230	31/33 = 93,9%	195/197 = 99,0%	226/230 = 98,3%

2. Reproducibilidad

Se llevó a cabo una evaluación en nuestros laboratorios del intraensayo y de la reproducibilidad del interensayo. Se probaron seis muestras. En cada día de prueba, cada muestra se diluyó dos veces y después de cargó para cuatro replicados, resultando en un total de ocho pocillos para cada una de las seis muestras. Este protocolo se siguió durante tres días. A continuación, estos resultados se utilizaron para calcular los valores AU/ml medios, desviaciones estándar y CV porcentual. Las muestras se seleccionaron de manera que las muestras 5 y 6 fueran claramente negativas, las muestras 1 y 2 claramente positivas y las muestras 3 y 4 cerca del límite de referencia. Los resultados de este estudio se resumen en las tablas 9, 10 y 11 de abajo:

Tabla 9: Estudio de precisión MPO

Muestra	Resultados día 1		Resultados día 2		Resultados día 3		Precisión intraensayo			Precisión interensayo		
	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Día 1	Día 2	Día 3			
1	1350	1275	1905	1642	1478	1619	VI	1349	1684	1683	VI	1572
	1339	1453	1623	1623	1759	1655	DE	61,94	115,78	99,70	DE	184,98
	1298	1297	1817	1682	1778	1712	% CV	4,6	6,9	5,9	% CV	11,8
	1420	1360	1611	1571	1695	1766						
2	461	458	380	479	503	389	VI	431	436	455	VI	440
	422	397	412	454	482	417	DE	26,58	33,03	44,00	DE	35,33
	396	454	453	457	489	449	% CV	6,2	7,6	9,7	% CV	8,0
	441	416	405	444	496	412						
3	175	178	144	167	164	209	VI	175	160	182	VI	172
	169	173	156	175	195	187	DE	7,88	15,47	14,93	DE	15,58
	166	192	158	180	178	179	% CV	4,5	9,7	8,2	% CV	9,1
	171	175	134	167	169	171						
4	100	104	91	87	86	101	VI	113	97	93	VI	101
	110	99	114	98	94	84	DE	11,41	10,68	9,86	DE	13,32
	118	125	105	99	79	92	% CV	10,1	11,0	10,6	% CV	13,2
	130	114	101	80	108	101						
5	25	24	23	26	19	20	VI	25	25	23	VI	24
	27	27	29	19	23	23	DE	2,97	3,85	3,21	DE	3,39
	31	21	30	23	26	20	% CV	11,7	15,4	13,9	% CV	13,9
	24	24	28	22	28	25						
6	17	24	19	28	15	21	VI	19	18	24	VI	20
	19	19	17	21	17	23	DE	2,60	5,88	9,22	DE	6,76
	19	22	15	7	14	33	% CV	13,5	32,7	38,2	% CV	33,1
	18	16	18	19	31	39						

Tabla 9: Estudio de precisión PR-3

Muestra	Resultados día 1		Resultados día 2		Resultados día 3		Precisión intraensayo			Precisión interensayo		
	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2		Día 1	Día 2			Día 3
1	2535	2631	2723	2541	2447	2718	VI	2583	2620	2609	VI	2604
	2582	2674	2591	2713	2611	2596	DE	85,75	83,58	90,77	DE	84,36
	2501	2496	2649	2474	2597	2728/	% CV	3,3	3,2	3,5	% CV	3,2
	2726	2521	2632	2636	2542	2633						
2	1349	1536	1434	1501	1785	1414	VI	1387	1427	1491	VI	1435
	1318	1348	1408	1383	1489	1438	DE	96,71	68,84	144,02	DE	111,88
	1268	1445	1367	1517	1520	1452	% CV	7,0	4,8	9,7	% CV	7,8
	1323	1505	1325	1484	1547	1280						
3	113	118	109	119	107	116	VI	120	113	112	VI	115
	118	114	132	96	137	93	DE	7,76	11,92	14,42	DE	11,82
	137	118	108	124	98	110	% CV	6,4	10,6	12,8	% CV	10,3
	119	126	111	101	127	110						
4	79	79	73	85	81	79	VI	78	80	79	VI	79
	73	98	87	84	88	81	DE	9,67	7,06	5,80	DE	7,39
	70	76	76	73	73	72	% CV	12,4	8,8	7,3	% CV	9,4
	82	66	72	89	84	73						
5	15	22	28	15	14	16	VI	22	20	22	VI	21
	26	18	21	23	15	29	DE	3,74	6,75	6,57	DE	5,63
	21	23	7	27	22	19	% CV	17,3	33,5	30,6	% CV	26,7
	26	22	19	21	26	31						
6	53	53	54	48	52	56	VI	56	52	56	VI	55
	57	63	54	50	58	51	DE	4,43	3,56	6,52	DE	5,10
	52	61	56	50	66	46	% CV	7,6	6,8	11,6	% CV	9,3
	52	57	57	48	63	58						

Tabla 9: Estudio de precisión GBM

Muestra	Resultados día 1		Resultados día 2		Resultados día 3		Precisión intraensayo			Precisión interensayo		
	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2		Día 1	Día 2			Día 3
1	773	611	798	672	901	782	VI	733	740	812	VI	762
	829	809	651	700	812	752	DE	91,15	75,47	48,50	DE	79,35
	706	638	883	705	796	803	% CV	12,4	10,2	60	% CV	10,4
	840	659	743	766	865	782						
2	796	728	651	646	882	794	VI	742	714	842	VI	766
	736	674	729	824	970	790	DE	54,40	61,63	62,90	DE	80,31
	715	706	676	700	844	821	% CV	7,3	8,6	7,5	% CV	10,5
	846	732	777	706	859	779						
3	115	124	90	93	119	128	VI	116	87	112	VI	105
	127	95	76	80	118	107	DE	11,93	12,40	10,69	DE	17,28
	115	118	101	64	95	101	% CV	10,3	14,3	9,6	% CV	16,5
	130	103	98	91	116	109						
4	163	130	107	83	94	92	VI	112	98	98	VI	103
	118	89	103	101	115	106	DE	27,21	7,86	8,67	DE	17,74
	122	86	103	96	95	102	% CV	24,2	8,1	8,8	% CV	17,3
	108	82	97	90	89	94						
5	41	15	29	36	14	2	VI	22	21	25	VI	23
	25	29	21	20	24	29	DE	9,68	9,74	11,63	DE	10,06
	13	17	20	26	30	31	% CV	44,0	45,6	46,5	% CV	44,1
	13	23	16	3	38	32						
6	41	26	16	50	39	24	VI	28	33	21	VI	27
	7	18	35	32	17	27	DE	10,91	14,10	9,05	DE	12,51
	33	31	55	33	19	11	% CV	39,1	45,9	43,6	% CV	46,0
	30	37	32	10	15	14						

3. Reactividad cruzada

Los analitos MPO y PR-3 del sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** AIV Plus de ZEUS se evaluaron por si presentaban reactividad cruzada con otros anticuerpos e interferencias de componentes del suero. Para este estudio, se evaluaron un total de 35 muestras. Quince de las muestras eran positivas para varios anticuerpos de enfermedades autoinmunes e infecciosas. De los 15 evaluados, uno era reactivo para el analito MPO y la misma muestra era positiva para el analito PR-3. El analito GBM se evaluó por si presentaba reactividad cruzada con otros anticuerpos e interferencias de componentes del suero, usando un total de 26 muestras. Veintiséis muestras eran positivas para varios anticuerpos de enfermedades autoinmunes e infecciosas. De las 26 muestras evaluadas, todas fueron negativas para GBM, lo que demostró que hay poca probabilidad de reactividad cruzada. Además, se probaron 10 muestras con altos niveles de MPO y 10 muestras con altos niveles de PR-3 por si presentaban reactividad cruzada con GBM. Las 20 muestras fueron negativas para GBM, lo que demostró que hay poca probabilidad de reactividad cruzada entre MPO y PR-3 con GBM.

4. Sustancias interferentes

Se evaluaron un total de 20 muestras MPO/PR-3 que contenían sustancias potencialmente interferentes. Estos 20 muestras contenían, o bien, niveles anormales de hemólisis (n=5), bilirubina (n=5), concentración de IgG por encima de lo normal (n=5), o bien, niveles de lípidos por encima de lo normal (n=5). Dos de las muestras fueron positivas para los analitos MPO y PR-3. Se evaluaron un total de seis muestras GBM que contenían sustancias potencialmente interferentes. Estas seis muestras se añadieron con niveles anormales de hemólisis (n=2), bilirubina (n=2), niveles de lípidos por encima de lo normal (n=2), albumina (n=2), colesterol (n=2) o triglicéridos (n=2). El resultado cualitativo de las seis muestras no mostró cambios, salvo una muestra que se añadió con un nivel elevado de colesterol y dos muestras que se añadieron con niveles elevados de triglicéridos. Las muestras lipémicas pueden interferir en el resultado de este ensayo. Debe evitarse el uso de estos tipos de muestras.

REFERENCIAS

1. Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology. Br. J. Med. 285: 606, 1982
2. 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.
3. Feehally J, Wheeler DC, Walls J, et al: A case of microscopic polyarteritis associated with antineutrophilia cytoplasmic antibodies. Clin. Nephrol. 27: 214-215, 1987
4. 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.
5. 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.
6. Savage COS, Tizard J, Jayne D, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Kawasaki disease. Arch. Dis. Child. 64: 360-363, 1989.
7. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J: Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. J. Intern. Med. 238: 143-152, 1995.
8. Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterisation of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture syndrome: Kidney Int. 46: 823-829, 1994.
9. Wieslander J, Barr J, Butkowski R, Edwards S, Bygren P, Heinegard D, Hudson B: Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: Localization to noncollagenous regions of type IV collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3838-42, 1984.
10. Butkowski R, Wieslander J, Wisdom B, Barr J, Noelken M, Hudson B: Properties of the globular domain of type IV collagen and its relationship to the Goodpasture antigen. J. Biol. Chem. 262: 7874-7877, 1987.
11. Butkowski R, Langveld J, Wieslander J, Hamilton J, Hudson B: Localization of Goodpasture epitope to novel chain of basement membrane collagen. J. Biol. Chem. 260: 3739-3747, 1985.
12. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 4th Ed., 1999.
13. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed.Register 56:64175-64182, 1991.
14. Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12), 1997.
15. 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, Inc.

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, EE. UU.

Llamada gratuita (EE. UU.): 1-800-286-2111, opción 2

Internacional: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Página Web: www.zeusscientific.com

AtheNA Multi-Lyte y **SAVe Diluent** son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para consultas al Servicio de atención al cliente en EE.UU., contacte con su distribuidor local.

Para consultas al Soporte técnico, contacte con ZEUS Scientific, llame de forma gratuita o escriba a support@zeusscientific.com.

Para consultas al Servicio de atención al cliente y al Soporte técnico desde fuera de EE.UU., contacte con su distribuidor local.

© 2015 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

EC	REP	EMERGO EUROPE Molenstraat 15 2513 BH, The Hague The Netherlands Tel: +31 (0)70 345 8570 Fax: +31 (0)70 346 7299
----	-----	--