



**SISTEMA DE PRUEBA PR3-ANCA RELISA® PARA ANTICUERPOS
ANTIPROTEINASA 3**
Para uso diagnóstico in vitro
Para uso profesional
Número de catálogo: 7096-16

USO PREVISTO: se trata de un sistema de prueba por enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos antiproteinasa 3 (PR3) en suero humano. Este sistema se debe utilizar en la detección de anticuerpos asociados a la granulomatosis con poliangeítis y a otros tipos de vasculitis.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los anticuerpos anti neutrófilos citoplasmáticos (ANCA) son un grupo de anticuerpos que reacciona con los antígenos citoplasmáticos en los neutrófilos humanos. Aunque estos anticuerpos se identificaron por primera vez en 1964 (1), la primera vez que se describió su vinculación a una patología fue en 1982, cuando Davies et ál. reportó llos anticuerpos en ocho pacientes con glomerulonefritis necrosante segmentaria (2). En 1984, se reportaron otros cuatro pacientes con vasculitis y glomerulonefritis. En 1985, van der Woude et ál. demostraron que los ANCA estaban altamente asociados a la granulomatosis con poliangeítis y que los títulos de los anticuerpos guardaban relación con la actividad de la enfermedad (3). En 1988, Falk y Jennette publicaron que los ANCA presentaban más de una especificidad antigénica (4). Un estudio posterior demostró que la especificidad de los ANCA se encontraba relacionada con las características patológicas de las vasculitis (5).

La detección de los ANCA se realiza habitualmente mediante análisis por inmunofluorescencia indirecta. En esta prueba, se pueden observar diferentes patrones de tinción celular. Se han descrito y caracterizado dos patrones principales de tinción cuando se utilizan neutrófilos fijados en etanol en el análisis de los ANCA por inmunofluorescencia. Los anticuerpos que presentan un patrón citoplasmático granular fino, llamado C-ANCA, suelen ir dirigidos contra una serina proteasa, la Proteinasa 3 (PR-3). Se ha demostrado que estos anticuerpos presentan un elevado grado de asociación a la granulomatosis con poliangeítis. El otro patrón de tinción importante, el perinuclear o P-ANCA, que normalmente se debe a los anticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (MPO), se ha asociado a la vasculitis sistémica y a la glomerulonefritis necrosante idiopática y con semilunas (4). Todas las muestras con resultado positivo en el análisis por inmunofluorescencia indirecta deben confirmarse como ANCA anti-MPO o ANCA anti-PR3 mediante un enzimoimmunoanálisis (EIA). Algunos autores consideran que todas las muestras de pacientes sobre los que exista una sospecha clínica se deben probar en EIA, ya que el 5% de las muestras son positivas solamente por EIA (6). A pesar de que la presencia de los ANCA anti-PR3 es más habitual en pacientes con granulomatosis con poliangeítis (hasta el 85% de los pacientes), estos no son específicos de esta enfermedad, puesto que también se pueden detectar, aunque en menor porcentaje, en pacientes con glomerulonefritis necrosante idiopática y con semilunas. De igual manera, los ANCA anti-MPO están asociados a la glomerulonefritis necrosante idiopática y con semilunas hasta en un 65% de pacientes, pero también aparecen en un porcentaje menor de pacientes con granulomatosis con poliangeítis. Por último, tanto los ANCA anti-MPO como los ANCA anti-PR3 se pueden detectar en la poliangeítis microscópica, cada uno en un 45% de los pacientes aproximadamente (7, 8, 9).

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

La prueba consiste en un EIA indirecto semicuantitativo. La superficie de los micropocillos se recubre con antígenos humanos MPO estabilizados para que actúe como sustrato antigénico en este sistema. En estos micropocillos, se colocan diluciones de muestras del paciente y se incuban, permitiendo que los anticuerpos específicos de la muestra reaccionen contra el antígeno en la fase sólida. Tras el lavado para eliminar los anticuerpos que no se unieron y otras proteínas séricas, los pocillos se incuban con anticuerpos antihumanos de cabra que se marcan con peroxidasa de rábano. La preparación de anticuerpos conjugada con la peroxidasa de rábano que se incluye en el sistema de prueba es específica de cadenas gamma de IgG.

Tras la incubación con el conjugado de peroxidasa de rábano, si los resultados son positivos se forma un complejo estable de tres partes. Este complejo consiste en anticuerpos antihumanos conjugados con peroxidasa de rábano unidos a anticuerpos humanos anti-PR3, que se encuentran unidos a los antígenos estabilizados en la superficie de plástico.

Tras un nuevo lavado, se detecta este complejo añadiendo una disolución de tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂ como sustrato cromogénico. La intensidad de color que se obtenga en cada pocillo será proporcional a la concentración de anticuerpos anti-PR3 en cada muestra de suero. Cada micropocillo se lee con un espectrofotómetro a 450 nm.

COMPONENTES DEL SISTEMA (MATERIALES SUMINISTRADOS)

Conservación: todos los componentes deben conservarse refrigerados a una temperatura de entre 2 y 10 °C. No se deben congelar.



Estabilidad: todos los componentes son estables durante al menos 12 meses a partir de la fecha de fabricación. No utilice ninguno de los componentes después de la fecha de caducidad.



REACTIVOS

Tiras de pocillos recubiertos con PR3 RELISA® **PLATE:** n.º de catálogo 7008-16. Placa de pocillos con doce tiras de ocho pocillos recubiertos con PR3 humana. Las tiras son de color verde. En caso de que se necesiten menos de ocho pocillos para las pruebas, estos se pueden separar. Para conservar los pocillos no utilizados (durante un máximo de 45 días), se pueden volver a colocar en la bolsa metálica con la bolsa desecante, cerrar con el autocierre y guardar en el frigorífico.

Diluyente de muestras RELISA® **SOLN|DIL:** n.º de catálogo 7100 (100 ml). Diluyente de muestras tamponado patentado para diluir las muestras de los pacientes.

Reactivo de anticuerpos y enzimas RELISA® específico para la cadena gama de IgG humana **CONJ|HRP:** n.º de catálogo 7009-16 (14 ml). IgG (específica de cadena gamma) antihumana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). El reactivo se encuentra listo para su uso.

Solución de sustrato RELISA® **SOLN|SUB**   : n.º de catálogo 7035 (14 ml). Solución de sustrato de enzimas específicas de HRP que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El reactivo se encuentra listo para su uso. **PELIGRO:** Inflamable. Este reactivo contiene menos de 25% de metanol y acetona. Manténgalo fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico.

Reactivo de parada RELISA® **SOLN|STOP**   : Número de catálogo 7033 (14 ml). Reactivo de parada patentado para los sistemas de análisis EIA de Immuno Concepts. Listo para usar. **PELIGRO:** Corrosivo. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

Sueros estándar (calibradores) de PR3 RELISA® **CAL:** números de catálogo 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (2 ml cada uno). Sueros humanos que contienen anticuerpos anti-PR3. El valor de análisis de cada uno de estos sueros se indica en la etiqueta del vial. Estos sueros se encuentran en la apropiada dilución de trabajo y listos para su uso.

Control positivo para PR3 RELISA® [CONTROL+] : n.º de catálogo 7021-16 (2 ml). Suero humano de control positivo que contiene anticuerpos anti-PR3. Este suero se encuentra en la apropiada dilución de trabajo y listo para su uso.

Control negativo RELISA® [CONTROL-] : n.º de catálogo 7031 (2 ml). Suero humano de control negativo que no contiene anticuerpos anti-PR3. Este suero se encuentra en la apropiada dilución de trabajo y listo para su uso.

Control positivo RELISA® opcional, analizado y sin diluir para PR3 [OPT+] : n.º de catálogo 7022-16 (0,25 ml). Suero humano de control positivo que contiene anticuerpos anti-PR3. Este control positivo se debe tratar como un suero sin diluir. El valor de análisis de este suero se indica en la etiqueta del vial.

ELEMENTOS NO REACTIVOS

Soporte para micropocillos

Solución tampón de lavado:

Tampón PBS [PWDR|PBS] : n.º de catálogo 1011. Polvo salino tamponado con fosfatos (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contiene suficiente polvo tampón para formar un litro (los kits de pruebas completas contienen dos bolsas de polvo tampón para cada placa de 96 micropocillos).

Concentrado de tampón de lavado [SOLN|WASH] : n.º de catálogo 1031 (10 ml). Solución de Tween 20 al 5% que se deben usar en el tampón de lavado (los kits de pruebas completas contienen dos viales de concentrado de tampón para cada placa de 96 micropocillos).

Preparación: disuelva una bolsa de polvo tampón en un litro de agua destilada o desionizada. Añada todo el contenido de una botella de concentrado de tampón de lavado al PBS disuelto. Mezcle bien y conserve a 2-25°C durante 4 semanas como máximo, o hasta que aparezcan signos de contaminación u otras alteraciones visibles. La solución tampón de lavado debe encontrarse a temperatura ambiente (18 a 25 °C) antes de su uso.

OTROS MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)

Pipeteador volumétrico de precisión para dispensar volúmenes de 25 a 1000 µl
Pizeta para dispensar disolución tampón de lavado a los micropocillos, o sistema de lavado automático o semiautomático para los micropocillos
Recipiente de un litro para la disolución tampón PSB de lavado
Agua destilada o desionizada
Espectrofotómetro para leer la placa, capaz de medir la absorbancia a 450 nm
Tubos de ensayo para preparar las diluciones de suero
Papel secante o absorbente
Pipeteador multicanal de 8 canales
Guantes desechables
Cronómetro

PRECAUCIONES

1. Todos los materiales de origen humano utilizados para este producto han sido analizados mediante los métodos aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos de EE. UU. (FDA) y han dado resultados negativos (no repetidamente sin reacción) para el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), el virus de hepatitis C (VHC) y el antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg). Sin embargo, ningún método de análisis puede garantizar con total seguridad que no se encuentren presentes estos virus u otros agentes infecciosos. Por tanto, todos los materiales del kit se deben manipular como si fueran infecciosos.
2. Todas las muestras de pacientes se deben manipular según el nivel 2 de bioseguridad, tal como se recomienda en el manual de los Centros para el Control de las Enfermedades y de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. para toda muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosos: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* ("Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos"), edición de 1999.
3. La dilución de los componentes o su sustitución por otros distintos a los suministrados con el sistema puede producir resultados incoherentes.

4. Se emplea azida sódica (0,09%) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con las conducciones de plomo o de cobre y formar sales de azidas metálicas explosivas. Cuando se eliminan los reactivos, se deben purgar las tuberías con grandes cantidades de agua corriente para evitar que queden residuos en las mismas. La azida sódica es venenosa y puede ser tóxica en caso de ingestión.
5. Este kit es para uso de diagnóstico in vitro.
6. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y las mucosas. Si se produce el contacto, lave la superficie contactada con jabón germicida y con grandes cantidades de agua.
7. No fume, coma o beba en las zonas en las que se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
8. Evite siempre las salpicaduras y la generación de aerosoles.
9. Si los tiempos y temperaturas de incubación no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
10. La contaminación cruzada de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos. Las muestras deben permanecer dentro de los micropocillos durante las pruebas.
11. Se deben lavar y enjuagar a fondo los elementos de vidrio reutilizables para eliminar los detergentes antes de su uso. Todos estos elementos deben estar limpios y secos antes de su uso.
12. Todos los reactivos, micropocillos y muestras deben encontrarse a temperatura ambiente (18 a 25 °C) antes de su uso.
13. Debe utilizar guantes desechables cuando manipule las muestras y los reactivos, y lavarse bien las manos una vez que haya terminado.
14. La contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras puede dar resultados falsos.
15. El reactivo de parada es corrosivo y puede producir quemaduras. Este reactivo contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (menos del 3% de cada uno, por volumen) y debe ser manipulado con precaución. Manténgase fuera del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante y acudir al médico. No añadir agua a este reactivo en ningún caso.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Extracción: la muestra ideal es el suero. Se deben extraer aproximadamente 5 ml de sangre de forma aséptica mediante venopunción utilizando un tubo de vacío estéril u otro sistema de extracción adecuado. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (18 a 25 °C). Se debe separar el suero del coágulo por medio de centrifugación lo antes posible para minimizar la hemólisis.

Sustancias que pueden interferir: los sueros que presenten un alto grado de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano no se deben utilizar, puesto que estas condiciones pueden causar resultados anómalos. Las muestras que contengan partículas visibles se deben aclarar mediante centrifugado antes de la prueba.

Conservación: los sueros se deben conservar a temperaturas de entre 2 y 10 °C durante una semana como máximo. Si se retrasan las pruebas, se deben congelar los sueros a temperaturas de -20 °C o inferiores. No se deben utilizar frigoríficos o congeladores con sistemas de eliminación automática de la escarcha.

ATENCIÓN: Si las muestras de los pacientes se congelan y descongelan varias veces pueden provocar resultados falsos negativos o falsos positivos.

NOTAS GENERALES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Es extremadamente importante que todos los componentes del kit y las muestras de suero se encuentren a temperatura ambiente (18 a 25 °C) antes de su uso. Un litro entero de tampón de lavado puede tardar varias horas en alcanzar una temperatura de 20 °C tras sacarlo del frigorífico. Las temperaturas de incubación inferiores o superiores al intervalo indicado pueden conducir a resultados imprecisos. Tras el uso, se deben volver a guardar las muestras y los reactivos no utilizados en el frigorífico.
2. Los reactivos se deben mezclar bien invirtiendo despacio su recipiente antes de su uso. No sacuda ni agite los reactivos. Evite la formación de espuma.
3. Cuando se preparen diluciones de muestras, se deben secar las puntas de las pipetas antes de dispensar el suero en el diluyente de la muestra. Si se adhiere demasiada muestra a la parte exterior de la punta de la pipeta, los resultados se pueden ver afectados.
4. Se recomienda el uso de un pipeteador multicanal, ya que permite dispensar el reactivo de manera más uniforme y sus tiempos de incubación y de reacción son también más homogéneos.

- El lavado de los pocillos es extremadamente importante.** Los pocillos que no se hayan lavado adecuadamente presentarán altos valores de fondo y pueden provocar falsos positivos. Para un lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y rellénelos con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de estos, especialmente en el primer lavado tras la aspiración. Vuelque los pocillos para que se escurra el tampón de lavado y agite con giros secos de muñeca para eliminar los restos del mismo. Repita el proceso de lavado, llenando y vaciando los pocillos, de 3 a 5 veces. Por último, se deben golpear vigorosamente sobre papel absorbente u otro tipo de material absorbente para eliminar todos los restos del tampón de lavado. Se recomienda el uso de un sistema automático de lavado de los pocillos, ya que asegura un buen lavado de los mismos.
NOTA: Debido a los diferentes tipos de técnicas de lavado y de sistemas automáticos, se puede ajustar el número de lavados para lograr resultados óptimos. Cada laboratorio debe decidir el número de lavados más eficaz para su sistema de lavado.
- Si no se eliminan totalmente los restos del tampón de lavado, puede que la formación de colores no sea la esperada. Las tiras de los pocillos se deben escurrir sobre papel absorbente para reducir al máximo los restos del tampón de lavado.
- El tiempo de cada paso es fundamental. Todas las muestras de suero se deben diluir antes de comenzar el proceso y deben dispensarse en los micropocillos en el menor tiempo posible (no más de cinco minutos). Se deben ajustar los tamaños de los grupos de muestras a procesar para que la manipulación de las muestras se lleve a cabo de forma cómoda en este período de tiempo. Se recomienda el uso de un pipeteador multicanal, ya que facilita la manipulación de las muestras y los reactivos.
- A excepción de la última incubación (solución de sustrato), el inicio de cada período de incubación se produce una vez que se ha dispensado completamente la muestra o el reactivo. El tiempo de incubación de la solución de sustrato debe ser exactamente de 15 minutos por pocillo. Todas las muestras y todos los reactivos se deben dispensar en la misma secuencia y a un ritmo constante.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CÁLCULOS

- Substraiga el valor de la absorbancia del pocillo blanco de reactivos de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de estándar, control y muestra del paciente. Calcule los valores medios de absorbancia de los pocillos duplicados.
- Marque el valor medio de absorbancia de cada estándar en la hoja de trabajo de estándares de PR3 RELISA®. Dibuje la línea media entre los puntos de los estándares.
- Obtenga el valor de la muestra de cada paciente en unidades interpolándola a partir de la línea estándar.

MÉTODO OPCIONAL DE CALIBRACIÓN EN UN SOLO PUNTO

- Substraiga el valor de la absorbancia del pocillo blanco de reactivos de los valores de absorbancia obtenidos en los pocillos de estándar, control y muestra del paciente. Calcule los valores medios de absorbancia de los pocillos duplicados.
- Divida la concentración específica de anticuerpos del suero estándar n.º 3 (indicada en la etiqueta) entre el valor medio de la absorbancia de los pocillos de dicho calibrador para obtener el factor de conversión.
- Multiplique los valores de absorbancia de cada muestra por el factor de conversión para obtener la concentración específica de anticuerpos en unidades.
- Estos cálculos se pueden simplificar de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Valor del estándar n.º 3 (unidades)}}{\text{Absorbancia del estándar n.º 3}} \times \text{Absorbancia de la muestra}^* = \text{Valor en unidades de la muestra}$$

*Si los estándares y las muestras se extraen por duplicado, utilice la absorbancia media de los pocillos duplicados.

CONTROL DE CALIDAD

- El valor medio de absorbancia del estándar n.º 3 debe ser al menos de 0,400. Los valores de absorbancia inferiores a 0,400 indican una formación inadecuada de los colores y un fallo en el proceso. La formación inadecuada de los colores normalmente se debe al uso de reactivos fríos o a un mal cronometraje de uno o más pasos del análisis. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18 a 25 °C), y repita el proceso prestando especial atención al tiempo de cada paso.
- El pocillo de control blanco debe presentar un valor de absorbancia inferior a 0,150. Los valores de absorbancia del blanco mayores de 0,150 indican un lavado inadecuado o una contaminación de los reactivos, y el proceso no es válido.
- Las muestras con valores específicos de anticuerpos superiores al límite máximo del estándar n.º 5 se deben marcar como superiores al valor en unidades del estándar n.º 5.

4. Se debe trazar una línea estándar para cada ensayo (o se debe calcular el factor de conversión si se está utilizando el método opcional de calibración en un solo punto). Si se utiliza una línea estándar o un factor de conversión de otro ensayo, los resultados no serán válidos.
5. Cada laboratorio debe establecer y mantener sus propios valores de referencia (normales), en función de la población de pacientes y de otros factores propios del lugar.
6. El suero de control positivo es un suero humano con anticuerpos anti-PR3. Se trata de un control cualitativo que debe proporcionar un valor superior a 35 unidades.
7. El suero de control negativo es un suero humano que no contiene anticuerpos anti-PR3. Este control debe proporcionar valores inferiores a 35 unidades.
8. El suero de control positivo, analizado y sin diluir es un suero humano con anticuerpos anti-PR3. El valor del análisis de este control, en unidades de PR3, se indica en la etiqueta. Este intervalo de valores se ha establecido para abarcar el 99% de los valores esperados dentro de las variaciones estadísticas normales. Se pueden dar pequeñas desviaciones puntuales fuera de estos valores. Cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de aceptación o de rechazo en función de su experiencia con este análisis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS PACIENTES

Se trata de un análisis semicuantitativo. Se ha demostrado que los niveles de anticuerpos anti-PR3 aumentan y disminuyen durante la enfermedad, pero el significado clínico de cada nivel de anticuerpos se encuentra aún en estudio (9). Los valores en unidades obtenidos en este análisis se han diseñado únicamente para dividir a los pacientes en los siguientes grupos generales. Los pocillos de muestras de los pacientes cuyos valores sean superiores o iguales a 35 unidades se consideran positivos. Los pocillos de muestras de los pacientes cuyos valores sean inferiores a 35 unidades se consideran negativos. Cada laboratorio debe fijar sus propios valores de referencia y de corte en función de la población de pacientes que están siendo analizados. Los valores en unidades se ven afectados por factores relacionados con los pacientes, factores mecánicos (como la precisión del pipeteo) y factores relativos a la corrida de la prueba (como la temperatura y los tiempos). Los resultados sucesivos de los niveles de anticuerpos de un paciente pueden indicar un aumento o disminución de los mismos.

INFORMES SOBRE LOS RESULTADOS

Se debe indicar si los resultados de los anticuerpos anti-PR3 son positivos o negativos, junto con el valor en unidades. Los niveles de anticuerpos encontrados en una única muestra no tienen mucho significado clínico. Los resultados consecutivos de los niveles de anticuerpos de un paciente pueden indicar un aumento o disminución de los mismos, los cuales se ha comprobado que evolucionan con la enfermedad.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No se puede realizar ningún diagnóstico basado únicamente en la detección de anticuerpos ANCA anti-PR3. El médico debe interpretar estos resultados de forma conjunta con el historial y los síntomas del paciente, con los datos obtenidos en la exploración física y con otros procedimientos diagnósticos.
2. No se debe iniciar el tratamiento basándose únicamente en un resultado positivo en la prueba de anticuerpos anti-PR3. Se deben tener en cuenta también las indicaciones clínicas, otros datos analíticos y los indicios que observe el médico en la exploración.
3. Los resultados de esta prueba se deben utilizar junto con la información resultante de la evaluación clínica y de otros procedimientos diagnósticos para determinar el estado clínico del paciente.

VALORES ESPERADOS

En la población normal, el valor esperado es menor de 35 unidades (negativo). Se han detectado ANCA anti-PR3 en un 85% de los pacientes con granulomatosis con poliangeítis, en un 45% de los pacientes con poliangeítis microscópica y en un porcentaje menor de pacientes con glomerulonefritis idiopática necrosante y con semilunas (9).

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia se fijaron a partir de sueros analizados de 500 donantes de sangre sanos, de los cuales 239 eran mujeres y 261 hombres, y ninguno de los cuales presentaba un historial conocido de enfermedades reumáticas. Basándose en la curva ROC generada a partir de estos datos, se estableció que los valores normales se situaban por debajo de 35 unidades de PR3.

Debido a la variabilidad inherente a los análisis ELISA, los valores en unidades superiores o inferiores en cinco unidades al valor de corte entre valores positivos y negativos (es decir, entre 30 y 40 unidades) se deben interpretar con cautela. A la hora de interpretar los resultados del análisis, se deben tener en cuenta los resultados clínicos, los signos, los síntomas, los indicios que observe el médico y otros resultados analíticos.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

El sistema RELISA® de análisis de anticuerpos anti-PR3 de Immuno Concepts se comparó con otro sistema de análisis ELISA de PR3 que se distribuye comercialmente. La población estudiada estaba formada por 173 muestras que se enviaron a laboratorios clínicos para realizar pruebas de ANCA, MPO y PR3, pero sin diagnósticos específicos, 10 muestras de pacientes a los que se les había diagnosticado poliangitis microscópica, 15 muestras de pacientes a quienes se les había diagnosticado glomerulonefritis necrosantes con semilunas, 12 muestras de pacientes con un diagnóstico de panarteritis nudosa, 7 muestras de pacientes con granulomatosis eosinofílica con poliangeítis diagnosticado, 12 pacientes con vasculitis diagnosticada, 25 pacientes con diagnóstico de granulomatosis con poliangeítis, 261 muestras de donantes de sangre de sexo masculino y 239 de donantes de sangre de sexo femenino. Todas las muestras se probaron paralelamente en ambos sistemas. En función de estas comparaciones, se obtuvieron los siguientes resultados utilizando los cinco puntos de la curva de calibración:

Prueba anti-PR3 con el sistema de prueba comparado			
Immuno Concepts		Positivo	Negativo
RELISA® PR3	Positivo	179	8
Prueba de anticuerpos	Negativo	4	563

Estos datos revelan las siguientes estadísticas: sensibilidad relativa 97,8%; especificidad relativa 98,6%; y concordancia total 98,4%.

Entre las 8 muestras de las que se obtuvo un “falso positivo”, 2 mostraron un patrón P-ANCA de inmunofluorescencia, 4 mostraron un patrón C-ANCA de inmunofluorescencia y 2 no mostraron ningún patrón de inmunofluorescencia. Dos de las muestras que presentaron un patrón C-ANCA de inmunofluorescencia y positivo a PR3 según el sistema RELISA® procedían de pacientes a quienes se les había diagnosticado granulomatosis con poliangeítis y una de las muestras que presentaba un patrón P-ANCA de inmunofluorescencia y positivo a PR3 según el sistema RELISA® procedía de un paciente a quien se le había diagnosticado granulomatosis eosinofílica con poliangeítis. Estas muestras pueden provocar “falsos negativos” en el sistema de prueba comparado.

Los siguientes resultados se obtuvieron mediante el método opcional de calibración en un solo punto:

Prueba anti-PR3 con el sistema de prueba comparado			
Immuno Concepts		Positivo	Negativo
RELISA® PR3	Positivo	176	4
Prueba de anticuerpos	Negativo	7	567

Estos datos revelan las siguientes estadísticas: sensibilidad relativa 96,2%; especificidad relativa 99,3%; y concordancia total 98,5%.

REPRODUCIBILIDAD

La precisión del análisis se midió utilizando siete muestras con valores de ANCA anti-PR3 dentro del rango de la curva de calibración. Estas muestras fueron analizadas por duplicado en tres números de lote diferentes de tiras de pocillos recubiertos con antígenos en tres ocasiones diferentes y por tres especialistas diferentes. La precisión intraensayo e interensayo se muestra en las siguientes tablas:

PRECISIÓN INTRAENSAJO

n=21	Concentración (unidades)	DE	% CV
Muestra 1	125	7	5
Muestra 2	97	8	8
Muestra 3	74	3	4
Muestra 4	65	4	6
Muestra 5	59	4	7
Muestra 6	117	6	5
Muestra 7	240	11	5

PRECISIÓN INTERENSAYO

n=3	Concentración (unidades)	DE	% CV
Muestra 1	125	9	7
Muestra 2	97	7	8
Muestra 3	74	6	9
Muestra 4	65	10	15
Muestra 5	59	8	14
Muestra 6	117	16	14
Muestra 7	240	12	5

LINEALIDAD

Dentro del rango de la curva de calibración, el análisis es lineal, tal como se demuestra utilizando los métodos de las directrices del (NCCLS), *Evaluación de la linealidad de los métodos analíticos cuantitativos* (10).

VALIDACIÓN DE LA CALIBRACIÓN EN UN SOLO PUNTO

El uso de un calibrador de un solo punto se validó utilizando el mismo conjunto de 754 sueros que se utilizó como comparación en el sistema de prueba comparado. El análisis de regresión de esta comparación mostró un coeficiente de regresión (r^2) del 99,2%, y el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados mostró que no existían diferencias estadísticas significativas entre los dos métodos. Desde un punto de vista práctico, en esta comparación únicamente se registraron tres muestras (0,4%) con discrepancias en el diagnóstico entre el sistema de calibración en cinco puntos y el sistema opcional de calibración en un solo punto. Los valores en unidades de PR3 de todas estas muestras se encontraban cercanos a las 35 unidades, en un rango de entre 31 y 40 unidades (10). Este tipo de muestra constituye un problema de diagnóstico cualquier sistema de análisis y precisa ser evaluado con precaución por los profesionales que analizan las muestras e interpretan los resultados.

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Mediante el sistema de análisis de anticuerpos anti-PR3 RELISA[®] de Immuno Concepts, se analizaron un total de 40 sueros que contenían autoanticuerpos diferentes de los ANCA anti-PR3. Estas muestras incluían los patrones comunes de los anticuerpos antinucleares, como los homogéneos, los moteados y los nucleolares, así como anticuerpos contra componentes citoplasmáticos, como las mitocondrias, el aparato de Golgi y el citoesqueleto. Veinte de las muestras contenían factores reumatoides. Ninguna de estas muestras produjo un resultado positivo en el sistema de análisis de anticuerpos anti-PR3 RELISA[®] de Immuno Concepts.

BIBLIOGRAFÍA

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et ál. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. Lancet 2:344-345, 1964.
2. Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F., et ál. Segmental Necrotising Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? Br. Med. J. 285:606, 1982.
3. van der Woude, F. J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et ál. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. Lancet 1:425-429, 1985.
4. Falk, R. J., Jennette, J. C. Antineutrophil 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.
5. Jennette, J. C., Wilkman, A. S., Falk, R. J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-associated Glomerulonephritis and Vasculitis. Am. J. Pathol. 135:921-930, 1989.
6. Savage, J., Gillis, D., Benson, E., et ál. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Am. J. Clin. Pathol. 111:507-513, 1999.
7. Kallenberg, C. G. M. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase. En: Peter, J. B. y Shoenfeld, Y., eds. Autoantibodies. Ámsterdam (Países Bajos): Elsevier Science B. V. 1996: 53-60.
8. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M. S., DeRemee, R. A., y Gross, W. L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. Ann. Int. Med. 111:28-40, 1989.
9. Falk, R. J., Jennette, J. C. ANCA Small-Vessel Vasculitis. J. Am. Soc. Nephrol. 8:314-322, 1997.
10. Resultados registrados, Immuno Concepts, N.A., Ltd.

En caso de daño en el embalaje de protección, póngase en contacto con Immuno Concepts antes de su uso.



Fabricante



Representante autorizado en la Unión Europea



Límite de temperatura



Contiene suficiente para <n> pruebas



Consulte las instrucciones de uso



Aparato médico para el diagnóstico in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover (Alemania)



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827 (California, Estados Unidos)
Soporte técnico EE. UU.: (+1) 800 251 5115 Fuera de EE. UU.: (+1) 916 363 2649
Correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 7096-16-I,

4.11.02.003.082-Es

Rev 7.2

© Copyright 2020

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANCA ANTI-PR3 RELISA®

Todas las muestras, reactivos (incluida la solución tampón de lavado) y los micropocillos deben encontrarse a temperatura ambiente antes de su uso.

1. PREPARACIÓN DE LA HOJA DE TRABAJO

Marque la hoja de trabajo que se adjunta con el kit para indicar la ubicación de las muestras en los micropocillos. Analice los estándares por duplicado. Para utilizar la curva de varios puntos, se deben analizar los cinco sueros estándar. En el método opcional de calibración en un solo punto, analice solo el estándar n.º 3 por duplicado. Uno de los pocillos se utiliza como blanco de reactivos. Se recomienda el análisis por duplicado de cada control y muestra del paciente hasta que se alcance una precisión aceptable en el laboratorio.

2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN TAMPÓN DE LAVADO (PBS-Tween)

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón PBS en un litro de agua destilada o desionizada. Añada todo el contenido de una botella de concentrado de tampón de lavado al litro de PBS disuelto. Mézclelo bien. La solución tampón de lavado se puede tapar y conservar a una temperatura de entre 2 y 25 °C durante un máximo de cuatro semanas.

3. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Diluya las muestras de los pacientes a 1:40 añadiendo 25 µl de suero a 975 µl de diluyente de muestras. Para utilizar el control positivo opcional, analizado y sin diluir de PR3, dilúyalo de la misma manera que las muestras de los pacientes. Mézclelo bien. El calibrador, el control positivo y el control negativo se proporcionan a nivel de dilución de trabajo y no precisan ninguna otra dilución.

4. PREPARACIÓN DE LOS MICROPOCILLOS

Saque de la bolsa el número requerido de tiras de micropocillos y colóquelos en el soporte provisto. Los micropocillos deben quedar firmemente sujetos en el soporte. Precione firmemente ambos lados de cada tira de forma que encajen bien dentro del soporte. Si emplean pocillos individuales o menos de una tira completa de pocillos asegúrese de que queden bien encajados. Los pocillos que están bien encajados no se caerán si voltea el soporte al revés. Si se necesitan menos de ocho pocillos se pueden separar los que sean necesarios. Los pocillos sin usar se pueden regresar a la bolsa de aluminio con el sobrecito disecante, cerrándolo con el sello de cierre (cremallera), y refrigerándolo hasta un máximo de 45 días.

5. DISPENSACIÓN DE LAS DILUCIONES DE SUERO

Dispense 100 µl de las muestras diluidas de los pacientes, de los controles y de los calibradores en los pocillos adecuados que se hayan indicado en la hoja de trabajo. Dispense 100 µl de diluyente de muestras en el pocillo blanco de reactivos.

6. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 25 °C)

Se deben incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las tiras se deben proteger de las corrientes de aire y de los cambios de temperatura durante la incubación. Si lo desea, puede cubrir las tiras con cinta transparente o papel absorbente para protegerlas del polvo y de otros cuerpos extraños.

7. LAVADO DE LAS TIRAS (consulte las notas generales sobre el procedimiento 5 y 6)

Lave los pocillos de 3 a 5 veces con la disolución tampón de lavado PBS-Tween. Para un lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y rellénelos con disolución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de estos, especialmente en el primer lavado tras la aspiración. Vuelque los pocillos para que se escurra el tampón de lavado y agite con giros secos de muñeca para eliminar los restos del mismo. Repita el proceso de lavado, llenando y vaciando los pocillos, de 3 a 5 veces. Por último, se deben golpear vigorosamente contra papel absorbente u

otro tipo de material absorbente para eliminar todos los restos del tampón de lavado.

8. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO CON ANTICUERPOS Y ENZIMAS

Dispense 100 µl de reactivo de anticuerpos y enzimas en cada uno de los pocillos.

9. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (30 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 25 °C)

Se deben incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las tiras se deben proteger de las corrientes de aire y de los cambios de temperatura durante la incubación. Si lo desea, puede cubrir las tiras con cinta transparente o papel absorbente para protegerlas del polvo y de otros cuerpos extraños.

10. LAVADO DE LAS TIRAS

Lave los pocillos de 3 a 5 veces con la solución tampón de lavado PBS-Tween. Para un lavado manual, aspire el contenido de los pocillos y rellénelos con solución tampón de lavado. Evite la contaminación cruzada de estos, especialmente en el primer lavado tras la aspiración. Vuelque los pocillos para que se escurra el tampón de lavado y agite con giros secos de muñeca para eliminar los restos del mismo. Repita el proceso de lavado, llenando y vaciando los pocillos, de 3 a 5 veces. Por último, se deben golpear vigorosamente contra papel absorbente u otro tipo de material absorbente para eliminar todos los restos del tampón de lavado.

11. DISPENSACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SUSTRATO

Utilizando un cronómetro para garantizar tiempos adecuados, dispense 100 µl de disolución de sustrato en cada pocillo. La solución de sustrato se debe agregar a los pocillos a una velocidad constante, de manera que cada pocillo se incuba durante el mismo tiempo exactamente (15 minutos). La solución de sustrato de los pocillos incubados con muestras positivas se volverá de color azul, mientras que si son muestras negativas, el resultado será incoloro o azul muy claro.

12. INCUBACIÓN DE LAS TIRAS (15 minutos exactos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 25 °C)

Se deben incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos exactos. Las tiras se deben proteger de las corrientes de aire y de los cambios de temperatura durante la incubación.

13. DISPENSACIÓN DEL REACTIVO DE PARADA

Una vez incubado el primer pocillo durante 15 minutos exactos, añada 100 µl de reactivo de parada en cada pocillo, en el mismo orden y a la misma velocidad que se agregó la solución de sustrato. Tras la adición del reactivo de parada, la solución de sustrato azul se volverá de color amarillo y la solución incolora no sufrirá ningún cambio de color.

14. MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LOS POCILLOS

Los pocillos se deben medir en los 30 minutos siguientes a la adición del reactivo de parada mediante un espectrofotómetro para placas. Estos se leen a 450 nm en relación con el pocillo de control blanco. Si se dispone de un espectrofotómetro de longitud de onda dual, la longitud de onda del filtro de referencia se debe fijar a 600-650 nm. Si se leen los pocillos a 450 nm sin un filtro de referencia, los valores de absorbancia serán mayores.

ASISTENCIA TÉCNICA:

EE. UU.: (+1) 800 251 5115 Fuera de EE. UU.: (+1) 916 363 2649
Correo electrónico: technicalsupport@immunoconcepts.com

