

AESKULISA[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

**INSTRUCTION
MANUAL**

AESKULISA MPO

Ref 3303





| | |
|-----------------|------------------|
| Product Ref. | 3303 |
| Product Desc. | MPO |
| Manual Rev. No. | 003 : 2013-10-10 |

Manual de Instrucciones

Contenido

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Utilización | 1 |
| 2 | Aplicación clínica y principio del ensayo | 1 |
| 3 | Contenido del equipo | 2 |
| 4 | Almacenamiento y Caducidad | 2 |
| 5 | Precauciones | 3 |
| 6 | Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras | 4 |
| 7 | Procedimiento del ensayo..... | 4 |
| 8 | Interpretación Cuantitativa y Cualitativa | 7 |
| 9 | Datos Técnicos | 8 |
| 10 | Datos de funcionamiento | 8 |
| 11 | Bibliografía..... | 11 |



1 Utilización

AESKULISA MPO es un enzimoimmunoensayo en fase sólida que emplea mieloperoxidasa (MPO) nativa elevadamente purificada a partir de células polimorfonucleares de sangre periférica humana para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra MPO en suero humano. Los anticuerpos anti-MPO reconocen epitopos conformacionales específicos en la MPO nativa.

El ensayo es una herramienta para el diagnóstico de vasculitis sistémica autoinmune.

2 Aplicación clínica y principio del ensayo

Los anticuerpos contra mieloperoxidasa (MPO) pertenecen al grupo de los anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA) los cuales se dirigen contra componentes citoplasmáticos de los granulocitos del neutrófilo y monocitos. El test de inmunofluorescencia indirecta en neutrófilos fijados en etanol ha sido el método establecido para la detección de los ANCAs. Era aparente que algunos ANCAs creaban un patrón de fluorescencia citoplasmático (de ahí llamado cANCA) mientras que otros creaban un patrón perinuclear (el pANCA). Debido a que ambos patrones pueden cubrir múltiples antígenos, la inmunofluorescencia no es adecuada para satisfacer un diagnóstico diferencial de vasculitis; de ahí que cada test de IFI deba ser verificado con tests ELISA específicos.

Mientras que la proteinasa 3 es el antígeno específico principal para cANCA, se identificó que el principal antígeno para pANCA es la MPO pero otros componentes celulares (p.ej. lactoferrina, catepsina G, elastasa) pueden causar tinción perinuclear.

La MPO es un enzima de los gránulos primarios de los neutrófilos con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa. Su carga elevadamente negativa puede ser relevante para la localización en estructuras cargadas positivamente como la membrana nuclear y DNA, de ahí que sea responsable del patrón de tinción perinuclear de los anticuerpos anti-MPO en sueros de pacientes cuando se usan neutrófilos fijados en etanol en IFI.

Los ANCAs son marcadores importantes para el diagnóstico diferencial de la vasculitis autoinmune. Los anticuerpos contra MPO correlacionan con la vasculitis idiopática o asociada a glomerulonefritis crónica necrotizante y se encuentran frecuentemente en el 70% de los pacientes con poliangeítis microscópica y el 5-50% de pacientes con el síndrome de Churg-Strauss.

Principio del test

Las muestras de suero diluidas 1:101 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por el lavado en el paso siguiente. Después, las inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa (conjugado) se incuban y reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras dentro de la microplaca. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente. La adición del substrato-TMB genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene a través de ácido diluido (el color cambia a amarillo). La intensidad de formación de color a partir del cromógeno depende de la cantidad de conjugado unido al complejo antígeno-anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.

3 Contenido del equipo

| PARA SER RECONSTITUIDO | | | | |
|--|--------------------------|-----------------|----------------------|---|
| Artículo | Cantidad | Color del tapón | Color de la solución | Descripción/Contenido |
| Tampón de muestra (5x) | 1 x 20 ml | Blanco | Amarillo | Concentrado 5 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), a búmerina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| Tampón de lavado (50x) | 1 x 20 ml | Blanco | Verde | Concentrado 50 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), Tween 20, azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| LISTO PARA EL USO | | | | |
| Artículo | Cantidad | Color del tapón | Color de la solución | Descripción/Contenido |
| Control negativo | 1 x 1,5 ml | Verde | Incoloro | Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| Control positivo | 1 x 1,5 ml | Rojo | Amarillo | Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| Calibrador cut-off | 1 x 1,5 ml | Azul | Amarillo | Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| Calibradores | 6 x 1,5 ml | Blanco | Amarillo * | Concentración de cada cal brador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante) |
| Conjugado, IgG | 1 x 15 ml | Azul | Azul | Contiene: Inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino (BSA) |
| Substrato TMB | 1 x 15 ml | Negro | Incoloro | Terametilbenzidina estabilizada y peróxido de hidrógeno (TMB/H ₂ O ₂) |
| Solución de paro | 1 x 15 ml | Blanco | Incoloro | Ácido clorhídrico 1M |
| Placa Microtiter | 12 x 8 tiras de pocillos | N/D | N/D | Con tiras rompibles de pocillos. Consulte el párrafo 1 para obtener información sobre revestimiento. |
| * La intensidad del color aumenta con la concentración | | | | |
| MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO | | | | |
| Filtro de lectura de 450 nm para lector de tiras Microtiter y filtro de referencia recomendado de 620 nm (600-690 nm). Equipo de cristal (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensayo para disoluciones. Mezclador espiral, pipetas de precisión (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipeta múltiple ajustable (100-1000 µl). Dispositivo de lavado de la microplaca (pipeta de repetición o microcanal de 300 µl o sistema automatizado), papel absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4ª ed.). | | | | |

4 Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35-46°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35-46°F, por lo menos. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante, y séllelo bien.

5 Precauciones

5.1 Datos de riesgo para la salud

ESTE PRODUCTO ES SOLO PARA EL USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO . Por lo tanto, solamente el personal formado y especialmente asesorado en los métodos de diagnóstico in vitro puede realizar el ensayo. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este equipo contiene componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del equipo no están clasificados como irritantes de los ojos y la piel, recomendamos evitar el contacto de los mismos con los ojos y con la piel y utilizar guantes desechables.

¡AVISO! Los calibradores, controles y agentes contienen ázida de sodio (NaN_3) como conservante. El NaN_3 puede ser tóxico si se ingiere o se absorbe por medio de la piel o de los ojos. El NaN_3 puede reaccionar con la fontanería de plomo y de cobre y formar ázida metálica muy explosiva. Al tirar tirarla, deje correr una gran cantidad de agua para evitar que la ázida tome consistencia. Por favor, consulte los procesos de descontaminación del CDC u otras directrices locales o nacionales.

No fume, coma o beba mientras manipule el equipo. No pipetee con la boca.

Todo el material de fuente humana utilizado en algunos reactivos de este equipo (por ejemplo controles, standards) ha sido analizado a través de métodos aprobados y ha resultado ser negativo para HbsAg, Hepatitis C y HIV 1. No obstante, ningún test puede completamente garantizar la ausencia de agentes virales en ese tipo de material. Por lo tanto, manipule los controles, standards y muestras de los pacientes como si se trataran de auténticos transmisores de enfermedades infecciosas y según los requerimientos de manipulación de su país.

Como se indica en la sección Contenido del equipo, el equipo contiene material de origen animal que debe manipularse de acuerdo con la normativa nacional.

5.2 Instrucciones generales para la utilización

En caso de que observe defectos o datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

No mezcle o sustituya Control, Calibradores, Conjugado o microplacas de números de lote diferentes. Esto podría llevar a una variación de los resultados.

Deje que todos los componentes alcancen la temperatura (20-32°C/68-89,6°F) antes de utilizarlos. Agítelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para una óptima realización del ensayo.

Incubación: Se recomienda realizar las pruebas a 30°C/86°F para sistemas automatizados.

No exponga nunca los componentes a temperaturas más altas de 37°C/ 98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de substrato con puntas nuevas. Protega este reactivo de la luz. Nunca pipetee el conjugado con puntas previamente utilizadas con otros reactivos.

Un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado solamente en los resultados del ensayo realizado. Debe ser elaborado por el médico después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. Es necesario verificar el diagnóstico por medio de distintos métodos.

6 Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

Utilice preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe seguir los requerimientos de protocolo de su país.

No utilice muestras ictericas, lipemicas, hemolizadas o contaminadas por bacterias. Los sueros con partículas deben ser purificados por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35-46°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de dispensar

Diluya los reactivos concentrados:

Diluya el tampón de muestra concentrado a 1:5 con agua destilada (p.e. 20 ml en 80 ml)

Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:50 con agua destilada (p.e. 20 ml en 980 ml).

A fin de evitar errores, es aconsejable marcar las tapas de los distintos calibradores.

Muestras:

Diluya las muestras de suero a 1:101 con tampón de muestra (1x)

p.e. 1000 µl tampón de muestra (1x) + 10 µl suero. Mezcle bien la dilución.

Lavado:

Prepare 20 ml de tampón de lavado diluido (1x) para 8 pocillos o 200 ml para 96 pocillos p.e. 4 ml de concentrado en 196 ml de agua destilada.

Lavado automático:

Tenga en cuenta los volúmenes de exceso requeridos para purgar el instrumento y el volumen muerto en el dispensador del aparato.

Lavado manual:

Descarte el líquido de los pocillos invirtiendo la placa. Golpee vigorosamente el marco con los micropocillos sobre papel absorbente limpio manteniendo la placa invertida. Dispense 300 µl de tampón de lavado diluido dentro de cada pocillo y espere 20 segundos. Repita el procedimiento entero dos veces más.

Microplacas:

Calcule el número de pocillos necesarios para el ensayo. Saque los pocillos no utilizados del marco, póngalos de nuevo en la bolsa de plástico suministrada junto con el desecante y séllela bien (2-8°C/35-46°F).

7.2 Esquema de dispensación

Se sugiere dispensar los calibradores, controles y muestras como sigue:

| Para una interpretación cuantitativa | | | | | Para una interpretación cualitativa | | | | |
|--------------------------------------|-------|-------|-----|------|-------------------------------------|----|-----|---|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4... | | 1 | 2 | 3 | 4... |
| A | Cal A | Cal E | P1 | | A | NC | P2 | | |
| B | Cal A | Cal E | P1 | | B | NC | P2 | | |
| C | Cal B | Cal F | P2 | | C | CC | P3 | | |
| D | Cal B | Cal F | P2 | | D | CC | P3 | | |
| E | Cal C | PC | P3 | | E | PC | ... | | |
| F | Cal C | PC | P3 | | F | PC | ... | | |
| G | Cal D | NC | ... | | G | P1 | ... | | |
| H | Cal D | NC | ... | | H | P1 | ... | | |

CalA: calibrator A

CalD: calibrator D

PC: positive control

P1: patient 1

CalB: calibrator B

CalE: calibrator E

NC: negative control

P2: patient 2



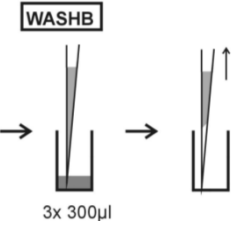
CalC: calibrator C

CalF: calibrator F

CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

7.3 Esquema de trabajo

| Paso | Descripción |
|-----------------------------|---|
| 1. | Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del pipeteado. |
| 2. | Siga los pasos descritos a continuación de acuerdo con los resultados de interpretación cuantitativa y cualitativa que se deseen obtener: |
| CONTROLES y MUESTRAS | |
| 3. |  <p>Pipetee en los pocillos designados (tal como se describe en el capítulo 7.2) 100 µl de:</p> <ol style="list-style-type: none"> Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interp. CUANTITATIVA o Calibrador cut-off (CC) para interp. CUALITATIVA y 100 µl de cada uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> Control negativo (CN) y control positivo (CP), y Suero diluido de los pacientes (P1, P2...) |
| 4. |  <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p> |
| 5. |  <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p> |

CONJUGADO

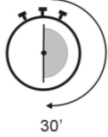
6.

CONJ



Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.

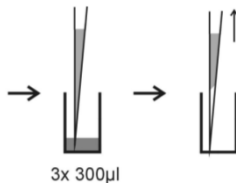
7.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.

8.

WASHB



Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).

SUBSTRATO

9.

SUB



Pipetee 100 µl de substrato TMB en cada pocillo.

10.

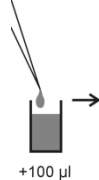


Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.

PARO

11.

STOP



Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el substrato.

12.

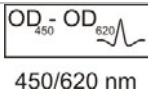


Incube durante 5 minutos como mínimo.

13.

Agite la placa suavemente durante 5 seg.

14.



Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.

8 Interpretación Cuantitativa y Cualitativa

Para una **interpretación cuantitativa** establezca la curva standard trazando la densidad óptica (DO) de cada calibrador (eje y) con respecto a los correspondientes valores de concentración en U/ml (eje x). Para unos mejores resultados recomendamos coordenadas log/lin y un ajuste a 4-PL. Partiendo de la DO de cada muestra, lea la correspondiente concentración de anticuerpo expresada en U/ml.

| Rango Normal | Indeterminado | Resultados Positivos |
|--------------|---------------|----------------------|
| < 12 U/ml | 12 - 18 U/ml | >18 U/ml |

Ejemplo de curva standard

NO utilice este ejemplo para interpretar el resultado del paciente

| Calibradores IgG | DO 450/620 nm | CV % (Variación) |
|------------------|---------------|------------------|
| 0 U/ml | 0,055 | 0,1 |
| 3 U/ml | 0,195 | 0,7 |
| 10 U/ml | 0,400 | 2,4 |
| 30 U/ml | 0,785 | 0,5 |
| 100 U/ml | 1,440 | 1,7 |
| 300 U/ml | 2,300 | 0,9 |

Ejemplo de cálculo

| Paciente | Replicado (DO) | Media (DO) | Resultado (U/ml) |
|----------|----------------|------------|------------------|
| P 01 | 0,794/0,792 | 0,793 | 32,1 |
| P 02 | 1,345/1,321 | 1,333 | 84,5 |

Las muestras que se encuentren por encima del rango máximo de calibrador se deberán especificar como >Máx. Será necesario diluirlas según se considere apropiado y repetir el ensayo. Las muestras que se encuentren por debajo del rango del calibrador deberán especificarse como < Mín.

Para conocer los datos específicos de lote, consulte el documento adjunto de control de calidad. Los laboratorios deberían realizar un Control de Calidad interno utilizando controles propios y/o un „pool“ de sueros interno tal y como contemplan las regulaciones nacionales.

Cada laboratorio debería establecer su rango normal propio basado en sus propias técnicas, controles, equipamiento y población según sus propios procedimientos establecidos.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el ensayo se considerará válido y deberá repetirse.

Será necesario realizar las siguientes comprobaciones de problemas técnicos: Fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, fotómetro, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar los elementos se obtuvieron valores exagerados, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos inexplicables, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Para la **interpretación cualitativa** lea la densidad óptica del calibrador cut-off y la de las muestras de los pacientes. Compare las DO de los pacientes con la DO del calibrador cut-off. Para la interpretación cualitativa, recomendamos que establezca un rango del 20% al rededor del valor del cut-off como zona indeterminada. Todas las muestras que tengan DO superior a este rango se consideran positivas y las muestras con valores de DO inferiores a este rango se consideran negativas.:

| | | | | | |
|----------------------|--------------|--------------------|-------------|-------------------------|---------------------------|
| Negativo | | DO paciente | < | 0,8 x DO cut-off | |
| Indeterminado | 0,8 x | DO paciente | ≤ | DO cut-off | ≤ 1,2 x DO cut-off |
| Positivo | | DO paciente | > | 1,2 x DO cut-off | |

9 Datos Técnicos

| | |
|-----------------------------|---|
| Muestra: | suero |
| Volumen de muestra: | 10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x |
| Tiempo total de incubación: | 90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F |
| Rango de calibración: | 0-300 U/ml |
| Sensibilidad analítica: | 1,47 U/ml |
| Almacenamiento: | a 2-8°C/35-46°F utilice solo los viales originales |
| Número de determinaciones: | 96 tests |

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

Los 60 análisis del tampón de muestra en AESKULISA MPO y los 8 análisis de 8 muestras de bajo negativo arrojaron un límite de detección de 1,47 U/ml.

10.2 Especificidad y Sensibilidad

Las microplacas se han revestido con mieloperoxidasa humana nativa. Los anticuerpos contra MPO se correlacionan con la glomerulonefritis rápidamente progresiva y necrotizante de origen idiopático o asociada con una vasculitis y se encuentran frecuentemente en alrededor del 60% de los pacientes con poliangeítis microscópica, en el 10-20% de pacientes con granulomatosis de Wegener y en el 30-50% de pacientes con el síndrome de Churg-Strauss.^{3,10}

Se analizaron 151 sueros de pacientes con granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica y otras enfermedades autoinmunes en el AESKULISA MPO y en un dispositivo homologado; de estos, 79 sueros estaban dentro del rango del ensayo y se utilizaron para un estudio comparativo frente a un dispositivo homologado.

| AESKULISA MPO | Dispositivo homologado | | | | |
|---------------|------------------------|------|-----------|------|-------|
| | | POS. | Equívocos | NEG. | Total |
| | POS. | 39 | 4 | 0 | 43 |
| | Neg. | 0 | 7 | 29 | 36 |
| | Total | 39 | 11 | 29 | 79 |

| | | Índice de confianza del 95% |
|--------------------------------------|-------|-----------------------------|
| Porcentaje de coincidencia general* | 94,9% | de 87,7% a 98,0% |
| Porcentaje de coincidencia positiva | 100% | de 91,0% a 100% |
| Porcentaje de coincidencia negativa* | 90,0% | de 77,0% a 96,0% |

* Para este cálculo, un resultado equívoco del dispositivo homologado se ha considerado como negativo.

Para un estudio comparativo clínico, solo se consideraron como positivas para el cálculo de la sensibilidad/especificidad diagnóstica las muestras que claramente debían contener anticuerpos MPO (glomerulonefritis, poliangeítis microscópica); el resto de los diagnósticos, aun con una posible presencia de anticuerpos MPO, se consideraron "como si fueran negativos" (datos completos disponibles previa solicitud).



| AESKULISA MPO | Diagnóstico | | | Total |
|------------------|-------------|------------|--|------------|
| | POS. | NEG. | | |
| | 32 | 6 | | 38 |
| | 2 | 99 | | 101 |
| Total | 34 | 105 | | 139 |

| | | Índice de confianza del 95% |
|--------------------------------------|-------|-----------------------------|
| Porcentaje de coincidencia general* | 94,2% | de 89,1% a 97,1% |
| Porcentaje de coincidencia positiva* | 94,1% | de 80,9% a 98,4% |
| Porcentaje de coincidencia negativa* | 94,3% | de 88,1% a 97,4% |

* Solo se han considerado las muestras con enfermedades con una presencia clara de anticuerpos MPO.

| Número de muestras con Diagnóstico | AESKULISA MPO | | |
|---|---------------|------------|------------|
| | POS. | NEG. | Total |
| Pérdida de audición aguda | 1 | 0 | 1 |
| Enfermedad renal crónica | 0 | 1 | 1 |
| Churg-Strauss | 0 | 2 | 2 |
| EPOC | 3 | 0 | 3 |
| Enfermedad de Crohn | 0 | 6 | 6 |
| Endocarditis | 0 | 1 | 1 |
| Síndrome de Goodpasture | 0 | 1 | 1 |
| Sanos | 1 | 0 | 1 |
| VIH | 0 | 1 | 1 |
| Parálisis | 0 | 1 | 1 |
| Polimialgia reumática (vasculitis) | 0 | 1 | 1 |
| Artritis reactiva | 0 | 21 | 21 |
| Artritis reumatoide | 0 | 1 | 1 |
| LES | 1 | 0 | 1 |
| Colitis ulcerosa | 0 | 6 | 6 |
| Colitis ulcerosa (infección fúngica séptica) | 0 | 1 | 1 |
| Granulomatosis de Wegener | 0 | 56 | 56 |
| <i>Glomerulonefritis (c-ANCA positivo)*</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Glomerulonefritis*</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Neurodegeneración asociada a la proteína de membrana mitocondrial*</i> | 30 | 0 | 30 |
| <i>Granulomatosis de Wegener/glomerulonefritis*</i> | 0 | 1 | 1 |
| Total | 38 | 101 | 139 |

10.3 Linealidad

Se han analizado con este equipo sueros seleccionados y se encontró que debían diluirse linealmente. No obstante, debido a la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos humanos, pueden haber muestras que no sigan esta regla.

| Muestra N° | Factor de dilución | concentración medida (U/ml) | concentración esperada (U/ml) | Recuperación (%) 90-110% |
|------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 1 | 1 / 100 | 76,5 | 78,0 | 98,1 |
| | 1 / 200 | 37,3 | 39,0 | 95,6 |
| | 1 / 400 | 19,2 | 19,5 | 98,5 |
| | 1 / 800 | 9,4 | 9,8 | 95,9 |
| 2 | 1 / 100 | 32,8 | 33,0 | 99,4 |
| | 1 / 200 | 17,4 | 16,5 | 105,5 |
| | 1 / 400 | 9,0 | 8,3 | 108,4 |
| | 1 / 800 | 4,2 | 4,1 | 102,4 |
| 3 | 1 / 100 | 342,15 | 325 | 105,3 |
| | 1 / 200 | 177,5 | 162,5 | 109,2 |
| | 1 / 400 | 85,8 | 81,25 | 105,6 |
| | 1 / 800 | 42 | 40,625 | 103,4 |
| 4 | 1 / 100 | 235,5 | 252 | 93,5 |
| | 1 / 200 | 121,15 | 126 | 96,2 |
| | 1 / 400 | 60,3 | 63 | 95,7 |
| | 1 / 800 | 33,65 | 31,5 | 106,8 |

10.4 Precisión

Para determinar la precisión del ensayo, se valoró la variabilidad (intra e inter-ensayo) a través del análisis de su reproducibilidad en ocho muestras de suero. Estas muestras fueron seleccionadas para representar un rango por encima de la curva standard.






| Intraensayo | | | Interensayo | | | Variabilidad lote a lote | | |
|----------------|--------------|--------|----------------|--------------|--------|--------------------------|--------------|--------|
| N.º de muestra | Media (U/ml) | CV (%) | N.º de muestra | Media (U/ml) | CV (%) | N.º de muestra | Media (U/ml) | CV (%) |
| 1 | 6,2 | 14,3 | 1 | 6,2 | 14,4 | 1 | 6,2 | 12,7 |
| 2 | 7,1 | 10,6 | 2 | 7,1 | 10,8 | 2 | 7,0 | 10,8 |
| 3 | 10,1 | 9,0 | 3 | 10,1 | 8,8 | 3 | 10,1 | 8,8 |
| 4 | 14,6 | 9,4 | 4 | 14,6 | 9,3 | 4 | 14,3 | 9,2 |
| 5 | 25,9 | 8,0 | 5 | 28,9 | 7,7 | 5 | 25,6 | 6,5 |
| 6 | 38,6 | 1,6 | 6 | 38,6 | 1,7 | 6 | 32,7 | 3,7 |
| 7 | 78,5 | 2,5 | 7 | 78,5 | 3,0 | 8 | 162,3 | 7,4 |
| 8 | 173,9 | 5,7 | 8 | 173,9 | 5,8 | 9 | 53,5 | 8,2 |

10.5 Calibración

Debido a la no existencia de una calibración de referencia internacional, este ensayo está calibrado en unidades arbitrarias (U/ml).

11 Bibliografía

- 1. Falk, RJ Jennette JC (1988).** *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.
- 2. Baslund B and Wiik A (1994).** *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and vasculitis.* Clin Rev Allergy; 12: 297-304.
- 3. Bosch X, Guilabert A, and Font J (2006).** *Antineutrophil cytoplasmic antibodies.* Lancet; 368: 404-418.
- 4. Savige J, Gillis D, Benson et al. (1999).** *International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA).* Am J Clin Pathol; 111: 507–13.
- 5. Talor MV, Stone JH, Stebbing J, Barin J, Rose NR and Burek CL (2007).** *Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA).* Clin Exp Immunol; 150: 42-48.
- 6. Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L et al. (1995).** *The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens.* Clin Exp Immunol; 101: Suppl 1, 15-17.
- 7. Sutton BJ, Little C, Olsen RL and Willassen NP (1988).** *Preliminary crystallographic analysis of human myeloperoxidase.* J Mol Biol; 199: 395-396.
- 8. Zeng J and Fenna RE (1992).** *X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution.* J Mol Biol; 226: 185-207.
- 9. Radice A and Sinico RA (2005).** *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA).* Autoimmunity; 38: 93-103.
- 10. Kallenberg CGM (2007).** *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase.* in *Autoantibodies* (ed. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL) (2007) 2nd Edition 95-103

| | | |
|---|--|--|
| IVD | - Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro | - For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό ηθό κέζ ο |
| REF | ° Numero d'ordine ° Référence Catalogue ° Bestellnummer ° Número de catálogo | ° Catalogue number ° Numéro de catálogo ° Αριθμός παραγγελίας |
| LOT | ° Descrizione lotto ° Lot ° Chargen Bezeichnung ° Lote | ° Lot ° Lote ° Χαραθερική κός παρηδας |
| CE | ° Conformità europea ° Déclaration CE de Conformité ° Europäische Konformität ° Declaração CE de Conformidade | ° EC Declaration of Conformity ° Declaración CE de Conformidad ° Εορπη αθρή ζακθφλια |
|  | ° 96 determinazioni ° 96 tests ° 96 Bestimmungen ° 96 Testes | ° 96 tests ° 96 pruebas ° 96 προζ δπρηκή κοί |
|  | ° Rispettare le istruzioni per l'uso ° Voir les instructions d'utilisation ° Gebrauchsanweisung beachten ° Ver as instruções de uso | ° See instructions for use ° Ver las instrucciones de uso ° Λάβετε σπύε ηης οδεγίες τρήζ ες |
|  | ° Da utilizzarsi entro ° Utilise avant le ° Verwendbar bis ° Utilizar antes de | ° Use by ° Utilizar antes de ° Χρήζε κέρρη |
|  | ° Conservare a 2-8°C ° Conserver à 2-8°C ° Lagerung bei 2-8°C ° Conservar entre 2-8°C | ° Store at 2-8°C (35-46°F) ° Conservar a 2-8°C ° Φοιάζ ζεηηής ηρος 2-8°C |
|  | ° Prodotto da ° Fabriqué par ° Hergestellt von ° Fabricado por | ° Manufactured by ° Fabricado por ° Καηαζ θεοάδερηαπό |
| CO-CAL | ° Calibratore cut-off ° Etalon Seuil ° Grenzwert Kalibrator ° Calibrador de cut-off | ° Cut off Calibrator ° Calibrador de cut-off ° Ορηθθός ορός Αληθραζ ηήρηη βαζ κολόκε ζε ες |
| CON + | ° Controllo positivo ° Contrôle Positif ° Positiv Kontrolle ° Controllo positivo | ° Positive Control ° Control Positivo ° Θεηηθός ορός είε γτ οσ |
| CON - | ° Controllo negativo ° Contrôle Négatif ° Negativ Kontrolle ° Controllo negativo | ° Negative Control ° Control Negativo ° Αρηε ηθός ορός είε γτ οσ |
| CAL | ° Calibratore ° Etalon ° Kalibrator ° Calibrador | ° Calibrator ° Calibrador ° Αληθραζ ηήρηη βαζ κολόκε ζε ες |
| RC | ° Recupero ° Corrélation ° Wiederfindung ° Recuperação | ° Recovery ° Recuperado ° Αλάθηε ζε |
| CONJ | ° Coniugato ° Conjugé ° Konjugat ° Conjugado | ° Conjugate ° Conjugado ° Σύδωγκα |
| MP | ° Micropiastra rivestita ° Microplaque sensibilisée ° Beschichtete Mikrotiterplatte ° Microplaca revestida | ° Coated microtiter plate ° Microplaca sensibilizada ° Επηθαιο κκέλε κίθροπηάθα |
| WASHB 50x | ° Tampone di lavaggio ° Tampon de Lavage ° Waschpuffer ° Solução de lavagem | ° Wash buffer ° Solución de lavado ° Ροζ κέζ ηθό δπη(οκα πλύ ζε ες |
| SUB | ° Tampone substrato ° Substrat ° Substratpuffer ° Substrato | ° Substrate buffer ° Tampón sustrato ° Ροζ κέζ ηθό δπη(οκα σποζ ηρωκαηος |
| STOP | ° Reagente bloccante ° Solution d'Arrêt ° Stopreagenz ° Solução de paragem | ° Stop solution ° Solución de parada ° Αληθραζ ηήρηη δπηθπηής αληδραζ ες |
| SB 5x | ° Tampone campione ° Tampon Echantillons ° Probenpuffer ° Diluente de amostra | ° Sample buffer ° Tampón Muestras ° Ροζ κέζ ηθό δπη(οκα δεηηκ άηρηλ |