

**Anti-B<sub>2</sub> Glycoprotein-I IgG**

Inmunoensayo quimioluminiscente totalmente automatizado para la determinación semi-cuantitativa de anticuerpos IgG anti-B<sub>2</sub> Glycoproteína-I (anti-B<sub>2</sub>GPI) en suero y plasma humano citratado en el sistema ACL AcuStar™, como ayuda en el diagnóstico de desórdenes trombóticos relacionados con el Síndrome Antifosfolípidos (APS) primario y secundario cuando se utiliza conjuntamente con otros datos de laboratorio y clínicos.

**Sumario y principio**

Los anticuerpos anti-B<sub>2</sub> Glycoproteína-I (anti-B<sub>2</sub>GPI) pertenecen a la heterogénea familia de los anticuerpos antifosfolípidos (aPL), los cuales son autoanticuerpos contra fosfolípidos aniónicos o complejos proteína-fosfolípidos. Niveles de anticuerpos aPL persistentemente elevados se asocian con un aumento del riesgo de trombosis vascular y complicaciones obstétricas. Esta asociación se conoce como Síndrome Antifosfolípidos (APS), clasificación propuesta por Harris en 1987. Los ensayos para la determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-B<sub>2</sub>GPI, anticuerpos IgG e IgM anticardiolipina (aCL) y anticuerpos anticoagulantes lipídicos son los ensayos de aPL incluidos en los criterios de clasificación revisados y acordados en la convención del Comité Internacional para el diagnóstico de APS realizada en 2006 en Sydney (Australia)<sup>1,2</sup>. Ambos ensayos, anti-B<sub>2</sub>GPI y aCL, conciben B<sub>2</sub> glycoproteína-I (B<sub>2</sub>GPI) humana en la fase sólida.

La B<sub>2</sub> Glycoproteína-I, también denominada apolipoproteína H, es una glicoproteína de 44 kDa con 5 dominios, que está presente en el plasma. El quinto dominio contiene un agrupamiento de aminoácidos con carga positiva que es responsable de la unión con fosfolípidos aniónicos. El mecanismo por el cual los anticuerpos antifosfolípidos anti-B<sub>2</sub>GPI y aCL reconocen la B<sub>2</sub>GPI no está claro. Se han propuesto dos teorías principales: la primera, que se conoce como la "teoría de la dimerización", considera que un anticuerpo debe unirse a dos moléculas de B<sub>2</sub>GPI para incrementar su avididad, y la segunda, la "teoría del epítopo cruzado", considera que el epítopo de unión de los anticuerpos anti-B<sub>2</sub>GPI y aCL sólo queda expuesto cuando la B<sub>2</sub>GPI se une a una superficie o a moléculas con carga negativa, tal como la cardiolipina<sup>3,4</sup>. Este epítopo se localiza en el dominio P.

El ensayo Hemosil AcuStar anti-B<sub>2</sub>GPI utiliza un inmunoensayo quimioluminiscente de dos pasos constituido por partículas magnéticas recubiertas con B<sub>2</sub>GPI humana purificada que capturan los anticuerpos antifosfolípidos anti-B<sub>2</sub>GPI, si estos están presentes en la muestra. Tras una incubación, separación magnética y lavado, se añade un trazador que está formado por un anticuerpo anti-IgG humana marcado con isotopio, el cual se une a las IgG anti-B<sub>2</sub>GPI capturadas en las micropartículas. Tras una segunda incubación, separación magnética y lavado, se añaden reactivos que inician la reacción luminiscente y la luz emitida se mide con el sistema óptico del ACL AcuStar en unidades relativas de luz (RLU). Las RLU son directamente proporcionales a la concentración de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI que contiene la muestra.

El ensayo ACL AcuStar anti-B<sub>2</sub>GPI IgG utiliza un método de reducción de datos con una curva logística de 4 parámetros (4PLC) para generar una Curva Maestra. La Curva Maestra se encuentra predefinida y depende del lote, y se almacena en el instrumento a través del código de barras del cartucho. Con la medición de los calibradores, la Curva Maestra predefinida se transforma en una nueva curva de 4PLC, la de Trabajo, específica para el instrumento. Los valores de concentración de los calibradores se incluyen en los códigos de barras de los tubos de los calibradores.

**Composición**

El kit de anti-B<sub>2</sub>GPI IgG está formado por:

- R** anti-B<sub>2</sub>GPI IgG Cartridge para 50 determinaciones (Cat. No. 0009802013): 1 cartucho que contiene 1 vial de una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con B<sub>2</sub>GPI humana purificada, 1 vial de tampón del ensayo, 1 vial de trazador formado por un anticuerpo anti-IgG humana marcado con isotopio, y 1 vial de diluyente de muestra que se utiliza para la predilución regular de la muestra y para la dilución automática en la función "run". Los reactivos están en una solución tampón "testo" o borato que contiene albúmina de suero bovino, B<sub>2</sub>GPI humana, IgG monoclonal de ratón, estabilizadores y conservantes.
- C1** anti-B<sub>2</sub>GPI IgG Calibrator 1 (Cat. No. 9802014): 1 x 1 mL de una solución de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI en tampón tampón que contiene albúmina de suero bovino, estabilizadores y conservantes, en tubo con código de barras.
- C2** anti-B<sub>2</sub>GPI IgG Calibrator 2 (Cat. No. 9802015): 1 x 1 mL de una solución de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI en tampón tampón que contiene albúmina de suero bovino, estabilizadores y conservantes, en tubo con código de barras.

Los calibradores son específicos del lote y no pueden usarse con otros lotes de reactivos.

**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

El material de origen humano utilizado en este producto ha sido analizado por métodos aprobados por la FDA y se ha encontrado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y para anticuerpos anti-HCV y HIV 1/2. Manejarlo con precaución como si fuese potencialmente infeccioso<sup>5</sup>.

Todos los reactivos contienen menos del 0,1% de azida sódica, que puede formar azidas explosivas en contacto con tuberías de metal. Utilizar procedimientos adecuados para su desecho.

Indicaciones de peligro: **ninguna**

Frasas de riesgo: **ninguna**

Frasas de seguridad: **ninguna**

Este producto es sólo para el diagnóstico *In vitro*.

**Preparación**

Cartucho anti-B<sub>2</sub>GPI IgG: Las micropartículas sedimentan durante el envío y el almacenamiento, por lo que se deben mezclar para conseguir su resuspensión.

- Cuando se utiliza el cartucho por primera vez, debe invertirse suavemente 30 veces, evitando que se forme espuma.

- Asegurarse de que las micropartículas estén totalmente resuspendidas. Si no lo están, continuar invirtiendo el cartucho hasta que se resuspendan completamente.

- Si las micropartículas no se resuspenden completamente, NO UTILIZAR EL CARTUCHO.

- Una vez que las micropartículas se han resuspendido, colocar el cartucho sobre una superficie sólida y sacar con cuidado la lengüeta roja de seguridad del cartucho.

- Manteniendo el cartucho sobre la superficie sólida, presionar las dos pestañas situadas en el lateral de la tapa perforada (parte gris) y presionar la parte superior del cartucho hasta que quede en posición de bloqueo. Una vez en la posición de bloqueo, las pestañas no deben ser visibles. No invertir el cartucho abierto.

- Una vez colocado en el instrumento, el cartucho es sometido a una agitación adicional periódica.

**Calibradores 1 y 2 anti-B<sub>2</sub>GPI IgG:** Son líquidos y se deben mezclar suavemente por inversión varias veces antes de usar para asegurar su homogeneidad. Evitar la formación de espuma.



**Atención:** No utilice el reactivo si observa cualquier alteración en el aspecto de los componentes del kit o cualquier daño en el material de embalaje.

**Conservación y estabilidad de los reactivos**

Los reactivos y calibradores que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del cartucho y de los tubos si se conservan a 2-8°C.

**anti-B<sub>2</sub>GPI IgG Cartridge** - Estabilidad tras apertura en el instrumento ACL AcuStar: 6 semanas.

**anti-B<sub>2</sub>GPI IgG Calibrator 1 & 2** - Estabilidad tras apertura en el instrumento ACL AcuStar: 3,5 horas.

Para una estabilidad óptima, retirar los calibradores del sistema y conservarlos a 2-8°C en el vial original con tapón.

**Método de ensayo**

Consultar el Manual del Usuario correspondiente del ACL AcuStar, donde se encuentran todas las instrucciones del ensayo.

**Recolección y preparación de las muestras**

**Plasma:** Recoger nuevo parás de sangre venosa recién extraída en una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para obtener más información sobre recolección, manejo y conservación de muestras, consultar el documento H21-A5 del CLSI (anteriormente NCCLSP).

Las muestras congeladas se deben descongelar rápidamente a 37°C. El ensayo se debe llevar a cabo en un plazo de 2 horas tras la descongelación.

**Suero:** El suero debe separarse del coágulo después de la recolección. Seguir las recomendaciones del documento H18-A3 del CLSI para las condiciones de almacenamiento de las muestras<sup>6</sup>. Centrifugar las muestras que contengan partículas visibles antes de realizar el ensayo.

**Reactivos adicionales y plasmas de control**

Los siguientes reactivos no se incluyen en el kit y deben adquirirse por separado.

ACL AcuStar anti-B<sub>2</sub> Glycoprotein-I IgG Control Cat. No. 0009802112

**Control de calidad**

Se recomiendan dos niveles de control para realizar un programa completo de control de calidad<sup>7</sup>. Los controles Hemosil AcuStar anti-B<sub>2</sub>GPI IgG bajo y alto se han elaborado para dicho programa.

Cada laboratorio debería establecer su propio promedio y su desviación estándar, además de implantar un programa de control de calidad para supervisar los ensayos del laboratorio. Los controles deben analizarse como mínimo una vez en cada turno de 8 horas de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Consultar el Manual del Usuario del instrumento si se desea más información. Consultar la publicación de Westgard et al. para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad<sup>8</sup>.

**Trazabilidad de los calibradores y controles**

Los valores indicados se establecieron mediante múltiples determinaciones con el sistema ACL AcuStar utilizando lotes específicos de reactivos y se compararon con un estándar interno. De acuerdo con las recomendaciones de la convención del Comité Internacional para el diagnóstico del APS realizada en Sydney<sup>9</sup>, las unidades del estándar interno para los anticuerpos IgG anti-B<sub>2</sub>GPI fueron referenciadas al anticuerpo químico HCL1<sup>9</sup>.

**Tipo de muestra**

Se analizaron con el ensayo anti-B<sub>2</sub>GPI IgG 26 muestras pareadas de plasma citratado y suero. Los valores de concentración se compararon por regresión de Passing & Babcock utilizando los valores de la muestra de plasma como referencia (y<sub>0</sub> X) y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. La pendiente y la intersección fueron 1,00 y 1,25 respectivamente, y la correlación (r) fue 0,9999.

**Resultados**

Los resultados de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI se expresan en U/mL (Unidades Arbitrarias de IgG). Estas unidades se establecieron asignando 20 U/mL a la respuesta del límite superior del rango de normalidad (LRNI) de 262 plasmas citrados de banco de sangre (porcentil 99). 1 U/mL corresponde a 1,55 ng/mL del anticuerpo químico HCL1. Este valor se ha obtenido por dilución manual del anticuerpo químico a 80 ng/mL, con solución salina tamponada conteniendo albúmina de suero bovino. La muestra se analizó como calibrador (sin pre-dilución automática) en el ACL AcuStar y el resultado fue luego dividido por el factor de dilución de la muestra establecido en las definiciones de ensayo.

**Atención:** El ACL AcuStar tiene en cuenta automáticamente la diferencia de dilución entre muestras de plasma y suero. Los valores reportados de las muestras de suero no tienen que corregirse por un factor.

Consultar el manual de usuario del ACL AcuStar si se desea más información.

**Limitaciones/sustancias interferentes**

No se puede hacer un diagnóstico definitivo en base a un resultado positivo de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI y se debe tener en cuenta la historia y los datos clínicos del paciente. Cuando se encuentra un resultado negativo de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI en presencia de sospecha clínica, se deben realizar otros ensayos de aPL, según se recomienda en la revisión de los criterios de clasificación definidos por el Comité Internacional para el diagnóstico de APS en reunión realizada en 2006.<sup>2</sup>

Los resultados de IgG anti-B<sub>2</sub>GPI en el sistema ACL AcuStar no son afectados por la hemoglobina hasta 500 mg/dL, por la bilirrubina hasta 18 mg/dL, por los triglicéridos hasta 1250 mg/dL, por la heparina (de bajo peso molecular y no fraccionada) hasta 2 IU/mL y por el factor reumatoide hasta 500 IU/mL.

En un estudio de reactividad cruzada se analizaron con el ensayo anti-B<sub>2</sub>GPI IgG 10 muestras positivas de cada una de las siguientes condiciones: factor reumatoide (RF), anticuerpos antinucleares (ANA) y sífilis (positivas por el test rápido de reacciones plasmáticas, RPR).

Este ensayo no ha sido validado para la población pediátrica.

Grupo de pacientes	N	N (Positivo)	% Positivo IgG a-B <sub>2</sub> GPI
RF	10	0	0,0%
ANA	10	2	20,0%
RPR	10	0	0,0%

**Valores esperados**

Se llevó a cabo un estudio del rango de normalidad con muestras de plasma citratado de donantes de sangre adultos y sanos utilizando reactivos y calibradores AcuStar anti-B<sub>2</sub>GPI IgG. De acuerdo con las recomendaciones del Comité Internacional de Sydney<sup>9</sup>, el valor umbral para clasificar una muestra como positiva de anticuerpos IgG anti-B<sub>2</sub>GPI se estableció en el percentil 99.

Sistema	N	Límite superior del rango normal (U/mL)
ACL AcuStar	262	20,0

Dado que son muchas las variables que pueden afectar a los resultados, cada laboratorio debería establecer su propio rango de normalidad.

**Características técnicas**

Todos los datos presentados se obtuvieron utilizando muestras de plasma citratado.

**Precisión:**

Se evaluó la precisión intraserial y la total (serie a serie y día a día) en múltiples series.

ACL AcuStar	Media (U/mL)	CV% (Intraserial)	CV% (Total)
Control bajo anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	19,1	7,8%	11,2%
Control alto anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	429	3,0%	3,8%
Muestra de plasma A anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	14,7	6,9%	10,9%
Muestra de plasma B anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	20,9	4,7%	7,9%
Muestra de plasma C anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	58,1	3,2%	5,0%
Muestra de plasma D anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	508	2,5%	3,9%
Muestra de plasma E anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	1470	2,5%	3,7%
Muestra de plasma F anti-B <sub>2</sub> GPI IgG	2694	3,7%	3,7%

**Comportamiento clínico:**

Se realizó un estudio con 321 plasmas citrados congelados de 6 grupos diferentes que incluyeron individuos seleccionados con diagnóstico de APS primario (PAPS), APS secundario (SAPS), lupus eritematoso sistémico (SLE) y SLE-simil por pruebas objetivas estándar. El quinto grupo era formado por pacientes con trastornos cardiovasculares pero no clasificados en los otros cuatro grupos. Un grupo de personas aparentemente sanas también fue incluido. Los resultados resumidos a continuación se basan en un valor umbral de 20 U/mL:

Grupo de pacientes	N	N (Positivo)	% Positivo
PAPS	23	14	60,9%
SAPS	45	45	65,2%
SLE-simil	115	20	17,4%
Otros	5	1	0,0%
Normales	103	0	0,0%

Considerando los grupos de pacientes PAPS y SAPS como positivos, la sensibilidad y especificidad clínicas y la concordancia global en porcentaje fueron:

Sistema	N	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	% Concordancia (95% IC)
ACL AcuStar	321	64,1%(53,5%-73,0%)	90,8%(86,3%-94,2%)	83,2%(78,6%-87,1%)

**Comparación de métodos**

Las muestras utilizadas en el estudio clínico que se encontraban dentro del rango de trabajo de los métodos comparados se probaron en un estudio de comparación de métodos con un test de ELISA comercial aprobado por la FDA. La concordancia de resultados positivos, negativos y global en porcentaje fueron:

Método referencia	N	Test ELISA		% Concordancia global (95% IC)
		Negativo	Positivo	
Hemosil AcuStar Anti-B <sub>2</sub> GPI IgG				
		Negativo	Positivo	
		80	0	
		19	51	
		% Concordancia positivos		
		% Concordancia negativos		
		% Concordancia global		
Test ELISA	150	100,0% (93,0%-100,0%)	80,8% (71,7%-88,0%)	87,3% (80,9%-92,2%)

Los resultados de precisión, comportamiento clínico y comparación de métodos se obtuvieron utilizando lotes controlados de reactivos y controles.

**Límite de detección: Sistema**

ACL AcuStar 6,4 U/mL

**Límite de linealidad: Sistema**

ACL AcuStar 6,4 - 6100 U/mL

Como la función "run" del instrumento está activada, éste lleva a cabo una dilución automática y controla el resultado final con el factor de dilución (20x), por lo que se expande el rango del ensayo a 122000 U/mL.

El ensayo no muestra efecto prozona. El protocolo de ensayo tiene un paso de lavado después de la incubación de la muestra, que evita el efecto prozona. Las muestras por encima de 6100 U/mL que se probaron durante el estudio de comportamiento clínico dispararon la función "run".