

Aplicación

Inmunoensayo quimiluminiscente totalmente automatizado para la determinación semi-cuantitativa de anticuerpos IgM anticardiolipina (aCL) en suero y plasma humano citratado en el sistema ACL AcuStar™, como ayuda en el diagnóstico de trastornos tromboticos 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 anticardiolipina (aCL) pertenecen a la heterogénea familia de los anticuerpos antifosfolípidos (aPL), los cuales son autoanticuerpos frente a fosfolípidos aniónicos o a complejos proteína-fosfolípidos. Niveles de anticuerpos antifosfolípidos 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 1987¹. Los ensayos para la determinación de anticuerpos IgG a IgM anticardiolipina (aCL), anticuerpos IgG a IgM anti-B₂GPI y anticuerpos anticoagulantes lipicos 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)^{2,3}. Ambos ensayos, aCL y anti-B₂GPI, contienen B₂ glicoproteínas (B₂GPI) en la fase sólida.

La B₂ glicoproteína, 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 aCL y anti-B₂GPI reconocen la B₂GPI no está claro. Se han propuesto dos teorías principales: la primera se conoce como la "teoría de la dimerización" y considera que un anticuerpo debe unirse a dos moléculas de B₂GPI para alcanzar un aumento de la avididad⁴, y la segunda, la "teoría del epítopo crítico" considera que el epítopo de unión de los anticuerpos aCL y anti-B₂GPI solo queda expuesto cuando la B₂GPI se une a una superficie o a moléculas con carga negativa, tal como la cardiolipina⁴. Este epítopo se localiza en el dominio IV.

El ensayo Hemosil AcuStar Anti-Cardiolipin IgM es un inmunoensayo quimiluminiscente de dos pasos constituido por partículas magnéticas recubiertas con cardiolipina y B₂GPI humana purificada que capturan los anticuerpos antifosfolípidos aCL, 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-IgM humana marcado con isotopio, el cual se une a las IgM aCL capturadas en las partículas. Tras una segunda incubación, separación magnética y lavado, se añaden reactivos que inician la reacción luminescente y la lectura se mide con el sistema óptico del ACL AcuStar en unidades relativas de luz (RLU). Las RLU son directamente proporcionales a la concentración de IgM aCL que contiene la muestra.

El ensayo ACL aCL IgM utiliza un método de reducción de datos con una curva logística de 4 parámetros (4PLC) para generar una Curva Masetera. La Curva Masetera 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 Masetera 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 plástico de los calibradores.

Composición

El kit de aCL IgM está formado por:

- R** aCL IgM cartucho para 50 determinaciones (Cat. No. 000982009): 1 cartucho que contiene 1 vial de una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con cardiolipina bovina y B₂GPI humana purificada, 1 vial de tampón del ensayo, 1 vial de trazador formado por un anticuerpo anti-IgM humana marcado con isotopio, y 1 vial de diluyente de muestra que se utiliza para la pre-dilución regular de la muestra o para la dilución automática en la función "run". Los reactivos están en una solución tampón isotónico o borato que contiene albúmina de suero bovino, cardiolipina bovina, B₂GPI humana, IgM monoclonal de ratón, estabilizadores y conservante.
- C1** aCL IgM Calibrator 1 (Cat. No. 9802010): 1 x 1 mL de una solución de IgM aCL en solución salina que contiene suero fetal bovino, estabilizadores y conservante, en tubo con código de barras.
- C2** aCL IgM Calibrator 2 (Cat. No. 9802011): 1 x 1 mL de una solución de IgM aCL en solución salina que contiene suero fetal bovino, estabilizadores y conservante, 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 infeccioso⁵. 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**

Frases de Riesgo: **Ninguna**

Frases de Seguridad: **Ninguna**

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

Preparación

Cartucho aCL IgM: 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 pastafitas situadas en el lateral de la tapa perforadora (parte gris) y presionar la parte superior del cartucho hasta que quede en posición de bloqueo. Una vez en la posición de bloqueo, las pastafitas no deben ser vistas. **No invertir el cartucho abierto.**
- Una vez colocado en el instrumento, el cartucho es sometido a una agitación adicional periódica.



Calibradores 1 y 2 de aCL IgM: Son líquidos y se deben mezclar por inversión varias veces antes de usar para asegurar su homogeneidad. Evitar la formación de espuma.

Atención: No utilice el reactivo si observe 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.

aCL IgM Cartidge®: Estabilidad tras apertura, en el instrumento ACL AcuStar: 6 semanas.

aCL IgM 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 NCCLS)⁶.

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 muestras⁶.

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.

AcuStar Anti-Cardiolipin IgM Controls Cat. No. 0009820108

Control de calidad

Se recomiendan dos niveles de control para realizar un programa completo de control de calidad⁷. Los controles AcuStar aCL IgM 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 calidad⁸.

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 de APS realizada en Sydney^{2,3}, las unidades del estándar interno para los anticuerpos IgM aCL fueron relacionadas al anticuerpo monoclonal EY2C9⁹.

Tipo de muestra

Se analizaron con el ensayo aCL IgM 61 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) y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. La pendiente y la intersección fueron 1,01 y 0,08 respectivamente, y la correlación (r) fue 0,999.

Resultados

Los resultados de IgM aCL se expresan en U/mL (Unidades Arbitrarias de IgM). Estas unidades se establecieron asignando 20 U/mL a la respuesta del límite superior del rango de normalidad (LSRN) de 250 plasmas citrados de banco de sangre (porcentil 99). 1 U/mL corresponde a 65,1 ng/mL del anticuerpo monoclonal EY2C9. Este valor se ha obtenido por dilución manual del anticuerpo monoclonal a 80 ng/mL con solución salina isotónico 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 del Usuario del ACL AcuStar si se desea más información.

Limitaciones/ Sustancias interferentes

No se puede hacer un diagnóstico clínico definitivo en base a un resultado positivo de IgM aCL y se debe tener en cuenta la historia y los datos clínicos del paciente. Cuando se encuentra un resultado negativo de IgM aCL 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 2006².

Los resultados de IgM aCL 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 U/mL y por el factor reumatoide hasta 500 U/mL.

En la interpretación de los resultados de ensayos aPL IgM, se debe tener en cuenta la posible interferencia de crioglobulinas.

En un estudio de reactividad cruzada se analizaron con el ensayo aCL IgM 10 muestras positivas de cada una de las siguientes condiciones: factor reumatoide (RF), anticuerpos antinucleares (ANA) y sífilis (positivos 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 IgM aCL
RF	10	0	0,0%
ANA	10	1	10,0%
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 con reactivos y calibradores AcuStar aCL IgM. De acuerdo con las recomendaciones del Comité Internacional de Sydney², el valor umbral para clasificar una muestra como positiva de anticuerpos IgM aCL se estableció en el percentil 99.

Sistema	N	Límite superior del rango normal (U/mL)
ACL AcuStar	250	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.

ACL AcuStar	Media (U/mL)	CV% (Intraensayo)	CV% (Total)
Control bajo aCL IgM	6,70	3,3%	4,9%
Control alto aCL IgM	86,1	3,3%	4,0%
Muestra de plasma A aCL IgM	14,7	3,0%	3,3%
Muestra de plasma B aCL IgM	19,2	2,6%	4,7%
Muestra de plasma C aCL IgM	19,5	2,6%	2,9%
Muestra de plasma D aCL IgM	207	3,6%	4,4%
Muestra de plasma E aCL IgM	556	6,8%	8,4%

Comportamiento clínico:

Se realizó un estudio con 321 plasmas citrados congelados de 6 grupos diferentes que incluyen individuos seleccionados con diagnóstico de APS primario (PAPS), APS secundario (SAPS), lupus eritematoso sistémico (SLE) y SLE-simil por pruebas objetivas estándares. El quinto grupo era formado por pacientes con trastornos cardiovasculares pero no clasificados en los anteriores 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	8	34,8%
SAPS	69	23	33,3%
SLE	115	10	8,7%
SLE-simil	5	0	0,0%
Otros	6	1	16,7%
Normales	103	1	1,0%

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	33,7% (24,2%-44,3%)	94,8% (91,0%-97,3%)	77,3% (72,3%-81,7%)

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. Los resultados de concordancia de positivos, negativos y global en porcentaje fueron:

Hemosil AcuStar aCL IgM	Test ELISA	
	Negativo	Positivo
Negativo	190	41
Positivo	4	32

Método referencia	N	% Concordancia positivos (95% IC)	% Concordancia negativos (95% IC)	% Concordancia global (95% IC)
Test ELISA	267	43,8% (32,2%-55,0%)	97,9% (94,8%-99,4%)	83,1% (78,1%-87,4%)

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

Límite de detección: Sistema

ACL AcuStar 1,0 U/mL.

Líneaalidad: Sistema

ACL AcuStar 1,0 - 774 U/mL.

Cuando la función "run" del instrumento está activada, éste lleva a cabo una dilución automática y corrige el resultado final con el factor de dilución (20x), por lo que se expande el rango del ensayo a 15480 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 774 U/mL que se probaron durante el estudio de comportamiento clínico dispararon la función "run".