



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS TÉCNICOS DE
PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE ARTRITIS REUMATOIDE EN EL HOSPITAL GUSTAVO
FRICKE**

Unidad de Investigación para optar al
Título de Químico Farmacéutico

FERNANDA ANDREA ADRIAZOLA ALVARADO

DIRECTORES
SELVA LETICIA LUNA
ENRIQUE CIFUENTES HUERTA

ABRIL 2019

RESUMEN.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de carácter autoinmune, sistémica y progresiva que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos en contra de la membrana sinovial. En Chile, la prevalencia de la AR es de un 0,46%, afectando principalmente a mujeres entre 45 y 75 años de edad. Actualmente se recomienda la determinación de Factor Reumatoide y Anticuerpos anti-CCP en suero para el diagnóstico de AR. El laboratorio clínico del Hospital Dr. Gustavo Fricke de Viña del Mar dispone de las técnicas de nefelometría y ELISA para medir ambos parámetros, sin embargo, hay nuevos posibles biomarcadores. El presente trabajo evaluó aspectos técnicos de las pruebas de laboratorio destinadas al diagnóstico de AR. Para ello se estimaron algunos aspectos del desempeño analítico de los métodos actualmente en uso y se propuso un nuevo método factible de ser implementado. El análisis de la calibración reporta que el equipo QUANTALYSER 2 presenta un CV de 15% para cada estándar, imprecisión aceptable en concentraciones iguales o menores a 120 UI/mL, LD 2,46 U/mL y LC 6,13 U/mL. Por otro lado, el equipo IMAGE 800 no posee detalles de registros de calibraciones. El análisis del control de calidad interno indicó que, en IMAGE 800, el CV no sobrepasa el 9%, en tanto para el QUANTALYSER 2 el CV es de 15%. En propuesta de un nuevo biomarcador, se reporta que los anti-CarP son los más estudiados, presentando una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 42% y 96%, respectivamente. La determinación de estos anticuerpos es mediante ELISA, existiendo al menos tres kits comerciales para su determinación. Los parámetros analizados de la calibración y CCI demuestran que las mediciones realizadas en ambos equipos cumplen con las especificaciones de cada proveedor, proponiéndose mantener un registro de las calibraciones del FR. La determinación de los anti-CarP en la Sección de Inmunología del HGF es factible, ya que dispone de la tecnología y capacitación de los operadores mínimos para su posible ejecución.

ABSTRACT.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, systemic and progressive disease characterized by the production of autoantibodies against the synovial membrane. In Chile, the prevalence of RA is 0.46%, affecting mainly women between 45 and 75 years of age. Currently the laboratory determines Rheumatoid Factor and anti-CCP antibodies in serum for the diagnosis of RA. The clinical laboratory of the Dr. Gustavo Fricke Hospital in Viña del Mar has nephelometry and ELISA to measure both parameters, however, there are new possible biomarkers. The present work evaluated technical aspects of laboratory tests for the diagnosis of RA. For this, some aspects of the analytical performance of the methods currently in use were estimated and a new feasible method of implementation was proposed. The calibration analysis reports that the QUANTALYSER 2 device has a CV of 15% for each standard, acceptable imprecision in concentrations equal to or less than 120 IU / mL, LD 2.46 U / mL and LC 6.13 U / mL. On the other hand, the IMMAGE 800 equipment does not have details of calibration records. The analysis of the internal quality control indicated that, in IMMAGE 800, the CV does not exceed 9%, while for the QUANTALYSER 2 the CV is 15%. In proposing a new biomarker, it is reported that anti-CarP are the most studied, presenting a diagnostic sensitivity and specificity of 42% and 96%, respectively. The determination of these antibodies is by means of ELISA, there being at least three commercial kits for their determination. The analyzed parameters of the calibration and internal quality control shows that the measurements made in both equipment comply with the specifications of each supplier, proposing to keep a record of the calibrations of the RF. The determination of the anti-CarP in the Immunology Section of the HGF is feasible, since it has the technology and training of the minimum operators for its possible execution.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Determinación de biomarcadores en el laboratorio clínico.....	2
Factor Reumatoide (FR).....	2
Anticuerpos anti-CCP.....	3
Lo actual para diagnóstico de AR en el HGF.....	4
OBJETIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	9
Calibración Instrumental.....	9
Control de Calidad Interno.....	12
Nuevo biomarcador diagnóstico en AR.....	14
Determinación de anti-CarP.....	15
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	25

INTRODUCCIÓN.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de carácter autoinmune, sistémica y progresiva que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos en contra de la membrana sinovial, una estructura conjuntiva ubicada en las articulaciones de tipo diartrodiales ^(1,2). La destrucción progresiva de esta membrana, además de provocar una disminución en la síntesis del líquido sinovial, imprescindible en la lubricación de las articulaciones, también produce efectos negativos en las estructuras adyacentes, tales como tendones y cartílago, provocando a largo plazo la erosión de los huesos.

El paciente con AR padece una inflamación crónica de las articulaciones que le genera dolor, quien, para contrarrestar este síntoma, disminuye la movilidad de sus extremidades lo que a largo plazo provoca una pérdida de masa muscular afectando así su calidad de vida ⁽³⁾. En Chile, al año 2002, un estudio poblacional dirigido por el Ministerio de Salud indica que la prevalencia de la AR es de un 0,46%, lo que significa que al menos 90.000 pacientes han sido diagnosticados con la enfermedad, afectando principalmente las mujeres entre 45 y 75 años de edad ⁽⁴⁾.

En la fase diagnóstica de la AR, el laboratorio clínico juega un rol relevante. La determinación de biomarcadores colabora en el diagnóstico temprano y diferencial de la AR, además de otorgar información acerca de la progresión de la enfermedad. Es por esto, que el comité American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) recomienda la determinación de dos biomarcadores: Factor Reumatoide (FR) y anticuerpos anti-CCP. En Chile, el Ministerio de Salud se rige por las recomendaciones de este comité internacional materializando las políticas públicas en la Guía Clínica AUGE de la Artritis Reumatoide, en la cual además establece la realización de

pruebas rutinarias que indiquen la presencia de inflamación sistémica, siendo éstos la Proteína C Reactiva y la Velocidad de Sedimentación Eritrocitaria ⁽⁵⁾.

Determinación de biomarcadores en el laboratorio clínico

Factor Reumatoide (FR)

El FR es una familia de autoanticuerpos que reconocen la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Dentro de esta familia de autoanticuerpos, la proporción mayoritaria es de tipo IgM, pero también pueden corresponder a isotipos tales como IgE, IgA e IgG ⁽⁶⁾.

En la actualidad, la detección del FR en la clínica ha constituido la base para el diagnóstico de la AR. El laboratorio clínico puede cuantificar estos autoanticuerpos mediante diferentes técnicas inmunoquímicas, las más comunes son la aglutinación de partículas de látex y nefelometría. La técnica de aglutinación consiste en el recubrimiento de anticuerpos IgG humanos con partículas de látex, quienes, al ser expuestos al suero del paciente con FR, tienden a agregarse pudiendo ser visualizados fácilmente. Esta técnica semi-cuantitativa permite la detección del FR de isotipo IgM, siendo significativo en títulos mayores de 1:80 ⁽⁷⁾. Si bien la técnica de aglutinación en látex es de bajo costo y sensible, ésta no permite conocer la concentración del FR en la muestra, por lo que actualmente se utiliza la nefelometría para su cuantificación ⁽⁸⁾. La nefelometría consiste en la medición de la dispersión lumínica que se genera luego de la formación de inmunocomplejos entre el FR y la IgG, reactantes provenientes del paciente y de la técnica, respectivamente. Si bien su costo es superior al test de aglutinación, este método es sensible, reproducible y además permite la detección del FR del isotipo IgM e IgG ⁽⁹⁾. Esto representa una ventaja ya que si bien, el isotipo IgM del FR es el más abundante, la cuantificación del isotipo IgG puede ayudar a conocer la cronicidad de la enfermedad, ya

que está implicado en la respuesta secundaria inmunológica siendo la inmunoglobulina con mayor especificidad contra el antígeno ⁽¹⁰⁾.

La producción de FR no se correlaciona a una condición en específico, ya que se ha observado su presencia en suero tanto en pacientes sanos como en pacientes diagnosticados con algún tipo de enfermedad autoinmune reumática. Se ha demostrado que el FR puede participar en procesos de eliminación de inmunocomplejos de nuestro organismo en el caso de infecciones causadas por bacterias o virus. En contraste, en una condición patológica como es la AR, la respuesta inflamatoria está mediada por estos inmunocomplejos capaces de activar el sistema de complemento mediante la vía clásica luego de interactuar con la proteína C1. Como resultado de la activación de esta cascada, es capaz de producirse la acumulación de productos de alta capacidad reactiva en las articulaciones amplificando el proceso inflamatorio ^(9,10).

Anticuerpos anti-CCP

La guía de ACR/EULAR incorporó la determinación de anticuerpos anti-CCP en el suero de los pacientes para complementar la información obtenida por el FR.

Los anticuerpos anti-CCP son una familia de autoanticuerpos de isotipo IgG, IgM e IgA que van en contra proteínas que contengan citrulina en su estructura, tales como fibrinógeno o vimentina ^(11,12). La citrulina es el producto de una modificación post-transduccional fisiológica de gran característica antigénica ⁽¹³⁾, por lo que un aumento de su concentración puede provocar la síntesis de autoanticuerpos. Este nuevo biomarcador presenta una sensibilidad diagnóstica similar al del FR, situándose entre un 75-80%, pero mejor especificidad diagnóstica que la reportada para el FR, ya que los trabajos reportados indican que la especificidad diagnóstica de este biomarcador es de

aproximadamente un 98% cuando se compara con individuos sanos, siendo superior al 85% reportado para el FR.

Para la determinación de anti-CCP se utiliza una técnica de inmunoanálisis denominada ELISA correspondiendo a un ensayo inmuno-enzimático donde un anticuerpo secundario conjugado con una enzima reconoce un complejo formado entre péptidos citrulinados cíclicos (CCP), aportados como reactivo, con los anticuerpos anti-CCP provenientes del suero del paciente. Luego de esta reacción, se pone en evidencia la enzima que forma parte de este complejo mediante la adición de un sustrato que se convierte en un producto coloreado. Finalmente, se cuantifica la presencia de estos autoanticuerpos mediante espectrofotometría ⁽¹⁴⁾.

A través del tiempo, se ha mejorado el diseño de la técnica ELISA para la detección de anticuerpos anti-CCP, definiendo esta evolución según generaciones de inmunoensayos. Actualmente, se comercializa ELISA de tercera generación que tiene la capacidad de detectar autoanticuerpos de isotipo IgA e IgG, logrando mantener la especificidad por ambas inmunoglobulinas ^(15,16). La detección de ambos isotipos es de utilidad para el diagnóstico de AR, ya que se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-citrulina IgA en pacientes, principalmente fumadores que ausentan del isotipo IgG, por lo que aumenta la sensibilidad diagnóstica del ensayo ⁽¹⁷⁾.

Lo actual para diagnóstico de AR en el HGF.

Al día de hoy, el laboratorio de Inmunología del Hospital Dr. Gustavo Fricke (HGF) de Viña del Mar realiza como parte de su rutina la técnica de nefelometría para la cuantificación del FR en suero. Mientras que para la detección de anti-CCP, hasta el año 2017 se ocupaba una técnica ELISA manual ⁽¹⁸⁾. Sin embargo, desde el año 2018 se

adquirió un equipo que permitió automatizar la técnica de ELISA. La utilización de ambos métodos automatizados para la determinación de tales biomarcadores hizo necesaria la descripción de su desempeño analítico y la comparación con la información bibliográfica disponible, principalmente con las especificaciones de los fabricantes.

A su vez, y como parte del concepto de mejora continua, el profesional de laboratorio debe mantenerse actualizado en lo que respecta a las nuevas pruebas que pueda ofrecer para apoyar al clínico en su búsqueda del diagnóstico correcto ⁽¹⁹⁾. En lo que respecta al diagnóstico de artritis reumatoide, la tecnología ha avanzado significativamente y existen nuevas pruebas que podrían ser de utilidad ^(20, 21, 22). Sin embargo, decidirse por alguna de ellas requiere el análisis riguroso de la información disponible y la factibilidad de aplicarla en la realidad del laboratorio clínico referido.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar aspectos técnicos de las pruebas de laboratorio para un mejor diagnóstico de Artritis Reumatoide en la sección de Inmunología de un hospital de alta complejidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar algunos aspectos técnicos del desempeño analítico de las pruebas para determinar Factor Reumatoide y anticuerpos anti-CCP en los equipos IMAGE[®] 800 y QUANTA LYSER[®] 2, respectivamente.
2. Contrastar resultados del desempeño analítico obtenidos de Factor Reumatoide y anticuerpo anti-CCP con datos del proveedor.
3. Proponer la detección de anticuerpos anti-proteínas carbamiladas como nueva técnica factible de ejecutar en el HGF.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Con la finalidad de evaluar los aspectos técnicos de las pruebas de diagnóstico para AR, en la Sección de Inmunología del HGF, se estudiaron los equipos IMAGE 800 de Beckman Coulter y QUANTA LYSER 2 de Inova Diagnostic. En primera instancia, se recopiló información acerca del funcionamiento, fundamento del método, sistema de calibración y control de calidad de ambos equipos. Para ello, se recurrió a los manuales de operación otorgados por los proveedores correspondientes en sus respectivas plataformas virtuales, además de consultar al profesional de laboratorio a cargo y a los representantes de los proveedores en Chile.

Una vez recopilada la información en relación a los aspectos técnicos básicos de ambos equipos, se procedió a recuperar información de las curvas de calibrado y control de calidad interno al utilizar los controles Liquichek™ Immunology Control Nivel 3 y control positivo/negativo QUANTA Lite® CCP3.1 IgG/IgA ELISA, para FR y anti-CCP, respectivamente. Para la recuperación de los datos de las calibraciones realizadas en ambos equipos, se recurrió al sistema de almacenamiento de datos otorgados por los dispositivos y archivos impresos que son resguardados por el profesional de laboratorio. Además, se levantó la información resultante del control de calidad interno (CCI) de FR a partir del programa Unity (Biorad). En el caso de anti-CCP, la información del CCI se obtuvo del propio sistema de almacenamiento del equipo. Los datos recopilados abarcaron desde enero hasta octubre de 2018. Estos fueron ordenados en planillas según el biomarcador, registrando fecha, concentración de calibradores, lecturas de absorbancia y concentración.

Posteriormente, se aplicó estadística descriptiva para definir las características de calibración, límite de cuantificación y límite de detección, intervalo de confianza y estimar la precisión del método.

El límite de detección y límite de cuantificación (Anexo1) se calcularon a partir del promedio de las absorbancias del control negativo, las cuales fueron obtenidas luego del análisis de 32 corridas analíticas.

Para proponer la determinación de un nuevo biomarcador en la Sección de Inmunología del HGF, que sustituya o complemente a los ya existentes, se revisó información bibliográfica a partir de las bases de datos PubMed ⁽²³⁾ y EBSCO ⁽²⁴⁾. Se utilizó el cruce de las siguientes palabras claves: biomarcadores, artritis reumatoide, anticuerpos anti-proteína carbamylada, anticuerpos anti-proteína acetilada, sensibilidad y especificidad diagnóstica. Las publicaciones escogidas fueron seleccionadas según fecha de publicación, incluyendo desde año 2009 a 2019, además del indicador de impacto de la revista (SJR) en el sistema SCIMAGO ⁽²⁵⁾. Una vez definido el posible nuevo biomarcador para diagnóstico de AR, se analizaron las características técnicas considerando los métodos disponibles. Para ello, se acudió a la información publicada por los proveedores y a artículos científicos. También se indagó la disponibilidad de estuches comerciales en el mercado actual consultando web y listado de empresas distribuidoras presentes en Chile. El precio de los productos fue un factor importante para la elección del biomarcador a proponer y su factibilidad de implementación en la sección de Inmunología del laboratorio clínico del HGF, considerando las plataformas analíticas que dispone actualmente.

RESULTADOS.

Actualmente, el laboratorio clínico del HGF, sección de Inmunología, realiza dos técnicas para determinar FR y Anticuerpos anti-CCP. Para ello, este laboratorio dispone de un nefelómetro IMAGE 800 de Beckman Coulter y un equipo de ELISA automatizado QUANTA LYSER 2 de Inova Diagnostic.

El nefelómetro IMAGE 800 es un equipo automatizado capaz de determinar anticuerpos en suero, entre ellos el FR, mediante nefelometría cinética. La nefelometría es una técnica inmunoquímica en la cual se mide la dispersión de la luz en 90° respecto a un haz de luz incidente en una muestra ^(26,27). Esta dispersión de luz varía según la formación de inmunocomplejos.

El equipo QUANTA LYSER 2 es una estación de trabajo robótica que permite el desarrollo de la técnica de inmunoanálisis ELISA. Esta técnica es un tipo de ensayo enzimoinmunométrico semicuantitativo donde un anticuerpo secundario marcado con una enzima reconoce un complejo formado por los péptidos citrulinados cíclicos (CCP) adsorbidos en un pocillo y los anticuerpos anti-CCP provenientes del paciente ^(28,29). La formación de inmunocomplejos se evidencia, por una reacción colorimétrica del sustrato de la enzima.

Calibración instrumental.

El nefelómetro IMAGE 800 posee un sistema de calibración que consta de dos etapas. En la primera, se realiza una curva de calibrado a partir de 8 a 12 estándares de concentración conocida establecida por el fabricante y cuyos parámetros están almacenados en una tarjeta de código de barra. En la rutina, solo se realiza una calibración del sistema mediante el análisis de un solo calibrador, para el caso del FR, se

utiliza el Calibrador 5 Plus. Este calibrador se mide por duplicado para corroborar su aceptación por el sistema y se establece el factor de calibración para corregir la respuesta cinética medida, ajustándola a una respuesta teórica ⁽²⁷⁾.

Por ser el IMAGE 800 un sistema cerrado, no se pudo obtener los datos de calibración del sistema, contando solo con la información entregada por el equipo que indicó que la última calibración de sistema para el Factor Reumatoide ocurrió el 7 de septiembre de 2018.

El equipo QUANTA LYSER 2 posee un sistema de calibración convencional basado en la realización de una curva de calibrado de concentraciones crecientes en la misma corrida analítica en que van muestras y controles. Esta curva de calibrado se realiza a partir de cinco estándares que abarcan un rango de 15,62 U/mL a 250,00 U/mL. Las 32 corridas analíticas comprendidas entre enero hasta octubre de 2018, con sus respectivas calibraciones permitieron elaborar una curva modelo y estimar la imprecisión de cada punto (tabla 1 y figura 1A).

Tabla 1: Curva de calibración de anticuerpo anti-CCP por ELISA automatizado en QUANTA LYSER 2 de Inova Diagnostic.

Calibrador	Concentración (U/mL)	Promedio absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
A	15,62	0,224	0,032	14,2
B	31,25	0,407	0,059	14,5
C	62,50	0,710	0,098	13,7
D	125,00	1,104	0,139	12,6
E	250,00	1,784	0,263	14,8

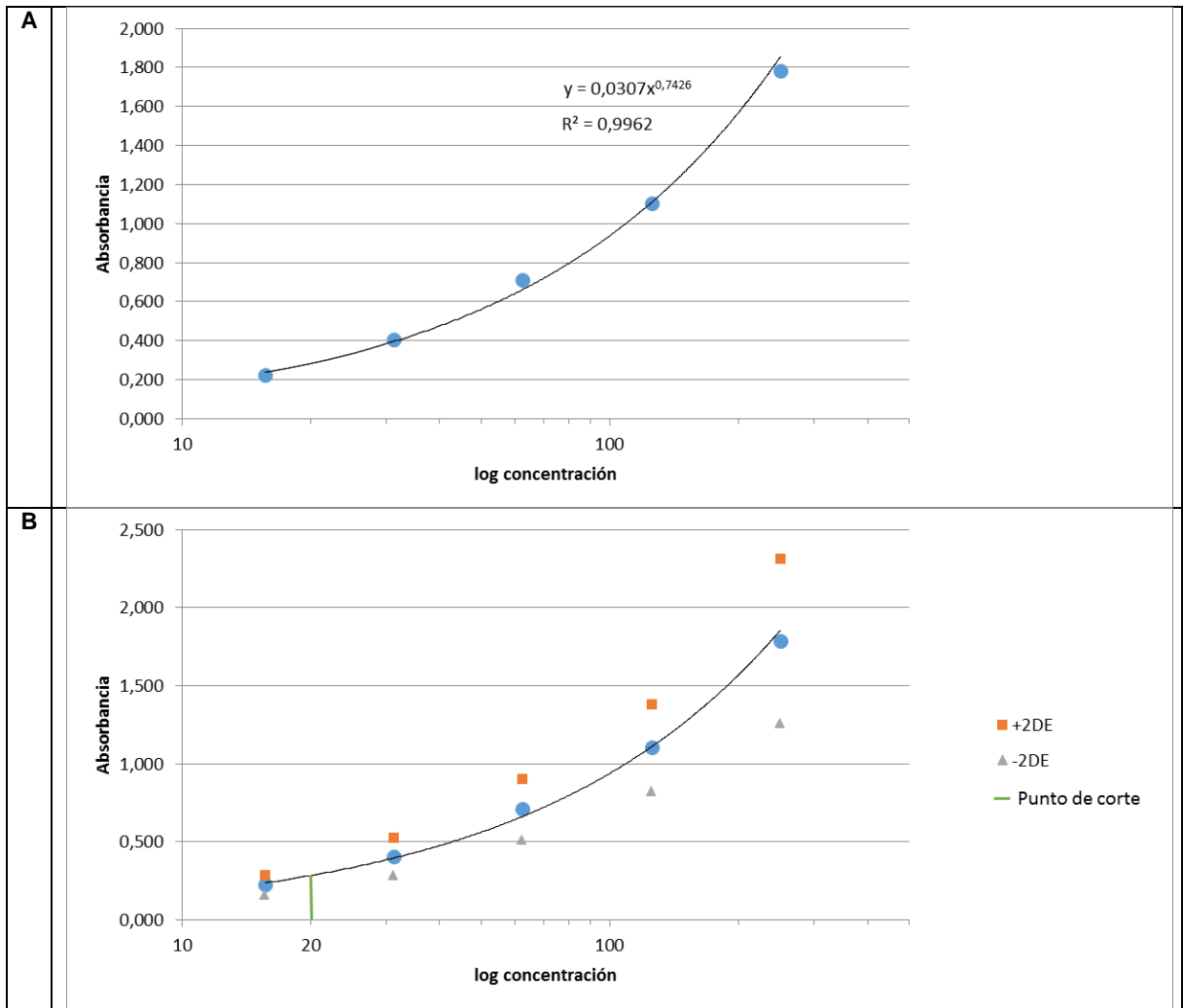


Figura 1. Representación gráfica de la curva de calibrado del ELISA para anti-CCP en equipo QUANTA LYSER 2. A: Curva de calibrado con ecuación y correlación. **B:** Curva de calibrado con envolvente de imprecisión correspondiente a +/- 2 DS donde se señala el punto de corte (cut off).

En la curva de calibrado resultante se observa que el método de ELISA presenta la relación directamente proporcional entre la concentración de los estándares y la absorbancia característica de un ensayo inmunométrico, curva que se ajusta a una función potencial (figura 1A). En la tabla 1 se puede observar que el coeficiente de variación de la lectura instrumental para cada concentración de estándar no supera el 15%.

En la Figura 1B se aprecia la imprecisión absoluta, calculada como $\pm 2DS$, de la lectura instrumental. Se observa que la imprecisión aumenta a medida que la concentración sube, mientras que a concentraciones bajas la imprecisión es considerablemente menor. Bajo el análisis observacional de esta figura, se aprecia una imprecisión aceptable en concentraciones iguales o menores a 120 UI/mL ya que el coeficiente de variación es 12% en este punto.

Los límites de detección y cuantificación del ELISA para anti-CCP fueron calculados a partir de 32 mediciones de control negativo, ya que el sistema no utiliza blanco o concentración cero. Estos resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Límite de detección y cuantificación del método ELISA automatizado para la determinación de anticuerpos anti-CCP en equipo QUANTALYSER 2.

Control negativo	Límite de detección		Límite de cuantificación	
	3DE	LD* (U/mL)	10DE	LC* (U/mL)
Promedio absorbancia				
0,035	0,025	2,46	0,083	6,13

- Ver fórmula de cálculo en Anexo 1

Control de Calidad Interno.

En la Sección de Inmunología, se monitoriza periódicamente la aptitud de los equipos implicados en la determinación de FR y anti-CCP. Esto se lleva a cabo mediante la aplicación del control de calidad interno.

El nefelómetro IMAGE 800 es controlado diariamente, mediante la determinación de un material de control BioRad. Las concentraciones de FR en esta solución control varían según su nivel y lote. La tabla 3 muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de

variación de las concentraciones resultantes del control de calidad interno. Se observa que el valor promedio de las lecturas obtenidas para el lote 66350 está bajo el rango establecido por el fabricante. Por otro lado, el promedio de las mediciones de los lotes restantes se encuentra dentro del rango informado por el proveedor. El coeficiente de variación de las lecturas instrumentales, para cada lote, no sobrepasan el 9%.

Tabla 3. Control de Calidad Interno de la detección de FR por nefelómetro IMAGE 800 del HGF utilizando Liquichek™ Immunology Control Nivel 3 de BioRad.

Información Inserto BioRad ⁽³⁰⁾			Control de Calidad Interno		
Lote	Rango QC nivel 3 (UI/mL)	Promedio (UI/mL)	Promedio (UI/mL)	Desviación estándar (UI/mL)	Coefficiente de variación (%)
66350	32,0-41,0	36,6	28,2	1,7	6
66370	21,2-54,8	38,0	32,9	3,0	9
66380	20,2-47,0	33,6	31,8	1,8	6

Tabla 4. Control de Calidad Interno del equipo QUANTA LYSER 2 del HGF.

	Información Inserto Inova Diagnostic	Control de Calidad Interno		
	Rango Absorbancia QC	Promedio Absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Control negativo	<0,200	0,035	0,009	15
Control positivo débil	Debe ser superior a 0,250 o el doble del control negativo	0,341	0,036	11
Control positivo fuerte	>1,000	1,784	0,264	15

En el caso del equipo QUANTA LYSER 2, el control de calidad interno es realizado con tres niveles: control negativo, control positivo débil y control positivo fuerte, los cuales se presentan en la tabla 4. Se observa que las absorbancias promedio, de los tres controles determinados, cumplen con las especificaciones del proveedor. La precisión de la técnica ELISA se ve representada con el coeficiente de variación en los tres niveles, mostrando valores que no superan el 15%.

Nuevo biomarcador diagnóstico en AR.

La determinación de FR y anticuerpos anti –CCP constituyen la base diagnóstica para la AR. Aun así, actualmente se busca un nuevo biomarcador que complemente o reemplace a los biomarcadores diagnósticos actualmente utilizados.

La revisión de literatura científica de los últimos 10 años cruzando palabras claves tales como: biomarcadores, artritis reumatoide, anticuerpos anti-proteína carbamilada, anticuerpos anti-proteína acetilada, sensibilidad y especificidad diagnóstica permitió seleccionar diversas investigaciones que se basan en la detección de nuevos autoanticuerpos dirigidos en contra diversas proteínas propias del organismo que presentan diversas modificaciones post-transduccionales como método diagnóstico de la AR ⁽²¹⁾, de ellos destacan anticuerpos anti-proteína carbamilada (anti.CarP) y anticuerpos anti-proteína acetilada.

Los anti-CarP son un grupo de inmunoglobulinas en contra de proteínas como, por ejemplo, vimentina, fibrinógeno y albúmina, que han sufrido carbamilación. Esta modificación es de tipo no enzimática y consiste en la conversión de lisina en homocitrulina, reacción mediada por cianuro ⁽³¹⁾. La homocitrulina es similar, en estructura,

a la citrulina diferenciándose sólo en un átomo de carbono de su cadena lateral, presentando propiedades antigénicas similares ⁽²¹⁾.

Por otro lado, los anti proteína acetilada son autoanticuerpos dirigidos en contra de proteínas que presentan grupos acetilados en un amino libre de la lisina. La acetilación es una reacción que ocurre normalmente en el organismo como, por ejemplo, la acetilación de histonas que tienen un rol importante en la transcripción nuclear y de otras proteínas que participan en diversas vías enzimáticas ⁽²²⁾. Además, la síntesis de inmunoglobulinas acetiladas ha sido relacionada con la disbiosis intestinal, observándose que al aumentar los desechos bacterianos acetilados predispone a la producción de este tipo de autoanticuerpos y citoquinas que contribuyen a la persistencia de la AR ^(32,33).

A diferencia de lo poco que se conoce de los autoanticuerpos anti proteínas acetiladas, los anti CarP han centrado la atención científica publicándose numerosos estudios que abordan desde aspectos técnicos hasta su utilidad clínica en distintas enfermedades reumáticas autoinmunes, especialmente en AR. Es por esta razón que se seleccionó este nuevo biomarcador para el desarrollo del presente trabajo.

Determinación de anti-CarP.

A raíz de la similitud estructural entre citrulina y homocitrulina, la detección y cuantificación de proteínas homocitrulinadas o carbamiladas puede ser un desafío para el método analítico empleado. Normalmente, los estudios que se basan en la determinación de los anticuerpos anti-CarP utilizando una técnica inmunoquímica por su alta sensibilidad y especificidad analítica, por ejemplo, la técnica de ELISA ⁽⁹⁾.

Shi et.al, año 2013, desarrolló la investigación pionera en la determinación de anticuerpos anti-CarP en suero de pacientes con AR mediante ELISA ⁽²⁰⁾. A tal fecha, no existía en el mercado un kit comercial que presentase antígenos carbamilados, siendo por esta razón

que la determinación de estos autoanticuerpos resultaba en un proceso extenso. Los antígenos necesarios para la detección de anti-CarP eran fabricados mediante la carbamitación de suero fetal bovino o FCS, para luego continuar con la adsorción de estos antígenos carbamitados en una microplaca donde se analizaban las muestras de los pacientes.

Desde la síntesis de los antígenos carbamitados hasta el análisis de las muestras, el procedimiento demoraba al menos 2 días. En la actualidad el mercado ofrece antígenos carbamitados listos para su uso ^(34, 35), reduciendo considerablemente el tiempo total del ensayo. Sumado a esto, la realización de diversos estudios para detectar anti-CarP en la población con AR y otras enfermedades reumáticas autoinmunes, ha impulsado a la industria a desarrollar estuches para la técnica ELISA en la detección de estos autoanticuerpos (tabla 5).

Tabla 5. Estuches comerciales para la detección de anti-CarP actualmente disponibles en el mercado.

Nombre	Fabricante	País de origen	Distribuidor en Chile	Precio
Human Anti-carbamylated Protein Antibody ELISA kit	MyBioSource ⁽³⁶⁾	Estados Unidos	No tiene	\$640
Anti-carbamylated Protein Antibody (ACPAb) ELISA Kit	Sincere ⁽³⁷⁾	China	No tiene	\$675
Human Anti-Carbamylated Protein Antibody ELISA Kit	NovaTeinBio ⁽³⁸⁾	Estados Unidos	No tiene	\$580

Como se puede observar en la tabla 5, existen al menos 3 proveedores de estuches que permiten la detección de anti CarP en muestras de suero. Estas empresas se encuentran principalmente en Estados Unidos, y ninguna posee distribuidor en Chile. Los valores de comercialización en el país de origen promedian los \$400.000 pesos chilenos. Además,

es importante considerar que los precios indicados corresponden a un costo basal o de catálogo que no incluye costo de envío, por lo que se debe elegir con cautela el posible estuche a utilizar para la detección de anti-CarP.

Es importante mencionar que la factibilidad de utilizar una nueva prueba de laboratorio se basa en su utilidad diagnóstica, por lo que se debe averiguar acerca de la especificidad y sensibilidad diagnóstica respecto a los Biomarcadores actualmente utilizados (tabla 6).

Tabla 6. Cuadro resumen de características analíticas y diagnósticas de Factor Reumatoide, Anticuerpos anti-CCP, Anticuerpos anti-proteína carbamilada.

Biomarcadores	Antígeno	Sensibilidad diagnóstica (%)	Especificidad diagnóstica (%)	Método de detección
Factor Reumatoide ⁽³⁹⁾	Fracción Fc de la Inmunoglobulina IgG	69	85	Nefelometría
Anticuerpos anti-CCP ^(40,41)	Citrulina	67	97	ELISA
Anticuerpos anti proteína carbamilada ⁽⁴²⁾	Homocitrulina	42	96	ELISA

Según la tabla 6, que resume la información reportada en estudios poblacionales realizados en países del hemisferio norte por ejemplo España, Reino Unido y Países Bajos, indicándose la utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-CarP quienes presentan una sensibilidad diagnóstica inferior a los otros biomarcadores, pero con una especificidad cercana al 96% similar a anti CCP.

DISCUSIÓN.

La AR es una patología de carácter autoinmune, degenerativa y crónica que puede progresar hasta observarse una erosión de los huesos en las articulaciones afectadas ⁽²⁾ disminuyendo la movilidad y la calidad de vida del paciente. En Chile, la Guía Clínica AUGE de Artritis Reumatoide 2010 ⁽⁴⁾ se basa en lo establecido por el comité ACR/EULAR ⁽⁴³⁾, y ambas manifiestan la necesidad de determinar Factor Reumatoide y Anticuerpos anti-CCP en suero para su diagnóstico.

La Sección de Inmunología del HGF analiza de forma rutinaria ambos biomarcadores en suero de pacientes. Para ello dispone de equipos automatizados que desarrollan técnicas inmunoquímicas como nefelometría y ELISA. La automatización de las técnicas otorga una rapidez en la entrega de resultados, alta reproducibilidad de ellos e incluso demuestran una disminución de errores analíticos en comparación a técnicas manuales ⁽⁴⁴⁾. Aun así, los sistemas automatizados no son infalibles, por lo que es necesario controlar periódicamente su desempeño analítico. Este trabajo se basó en el estudio de ciertos aspectos técnicos de los equipos IMAGE 800 y QUANTA LYSER, al recopilar información de las calibraciones y control de calidad interno en la determinación de Factor Reumatoide y Anticuerpos anti-CCP.

El nefelómetro IMAGE 800 es un equipo automatizado que detecta la formación de inmunocomplejos mediante nefelometría cinética. Posee un sistema de calibración en que se realiza una curva a partir de estándares de concentración conocida, información que es almacenada en el sistema informático del equipo, pero no puede ser recuperada de manera retrospectiva, sin embargo, el sistema informa al usuario la fecha de la última calibración. Si bien el fabricante establece, que la calibración de la técnica para Factor Reumatoide es estable por 30 días ⁽²⁷⁾, el estudio realizado no logró detectar la frecuencia

con que este laboratorio efectúa la calibración con un solo nivel de estándar, como es el Calibrador 5 Plus. Este aspecto es de relevancia ya que, de no mantenerse los parámetros de la curva, como por ejemplo la pendiente, podrían verse afectados los resultados de la interpolación de las lecturas instrumentales, y en consecuencia los valores de FR no serán representativos del estado de salud del paciente. Debido a esto, seguir la recomendación de calibración periódica establecida por el proveedor, es fundamental para reducir el margen de error sistemático entre las mediciones realizadas por el equipo ⁽⁴⁶⁾. Ante esta observación surge la necesidad de llevar un registro de las calibraciones efectuadas en este nefelómetro.

El QUANTA LYSER 2 realiza el método de ELISA ⁽²⁸⁾ que describe una curva de calibrado con función potencial (Figura A), permitiendo la búsqueda retrospectiva de todas calibraciones realizadas en un tiempo determinado. Por ello es posible calcular el coeficiente de variación para cada estándar, el que no supera el 15%, por lo que la precisión del método es catalogada como aceptable. Esta información ayuda a comprender que precisamente este método automatizado otorga menor error en la etapa analítica respecto al método manual anteriormente utilizado, el cual reportaba un CV superior al 20% para cada estándar de la curva de calibrado ⁽¹⁸⁾.

Si bien el CV de anti-CCP ha disminuido al implementar un método automatizado, es importante prestar atención a los valores extremos de su curva de calibrado ya que al analizar la imprecisión mediante una representación gráfica de +/- 2DE (figura 1B), se observó que a concentraciones mayores la imprecisión del método va en aumento, tendencia que coinciden con lo declarado por el fabricante ⁽²⁸⁾.

El método de QUANTA Lite CCP3.1 no presenta información referente al límite de cuantificación y límite de detección por parte del proveedor. Si bien estos parámetros se calculan en base a la lectura instrumental promedio de un blanco ⁽⁴⁷⁾, en esta ocasión se

realizó a partir del control negativo porque el estuche no tiene un estándar de concentración cero (blanco). La utilización del control negativo a modo de blanco se fundamenta en que la cantidad de autoanticuerpos que contiene es despreciable. A partir de la estimación del límite de detección y cuantificación, se observa que este método es capaz de discriminar anticuerpos anti-CCP desde los 2,46 U/mL, además de cuantificarlos desde los 6,13 U/mL. Al combinar los análisis de imprecisión mostrados en la figura 1A y 1B con el límite de cuantificación (tabla 2), se observa que las concentraciones comprendidas entre 6,13 U/mL y 120 U/mL mantienen una precisión aceptable.

Para evaluar la calidad de los resultados de los equipos IMAGE 800 y QUANTA LYSER 2, previo a cada corrida analítica, el laboratorio de la Sección de Inmunología aplica el control de calidad interno (CCI) definiéndose como el procedimiento mediante el cual se monitoriza la calidad de resultados obtenidos, permitiendo aceptar o rechazar las corridas analíticas ^(48,49). Este proceso consta de la medición de uno o más controles, adquiridos desde un proveedor, realizándose determinaciones periódicas las cuales deben posicionarse dentro de un rango de aceptabilidad preestablecido por el fabricante o el laboratorio.

El CCI para el equipo IMAGE 800 indicó un coeficiente de variación que no supera al 9% en los tres lotes utilizados (tabla 3), indicando que la precisión de las lecturas instrumentales obtenidas es considerada aceptable. Los promedios de las concentraciones experimentales obtenidas por el nefelómetro se encuentran dentro del rango de aceptabilidad informado por el proveedor, a excepción del primer lote reportado. Sin embargo, estos rangos permiten un error muy amplio entre las distintas lecturas instrumentales, siendo necesario adaptar los márgenes de aceptabilidad. Es por esto que, al haber un cambio de lote de material control, el profesional a cargo decide realizar las 20 primeras mediciones de esta matriz controlando según el rango de aceptabilidad indicado

por el proveedor. A partir de estas 20 mediciones, se adaptan estos intervalos según la realidad de cada laboratorio, considerando el análisis estadístico descriptivo correspondiente ⁽⁵⁰⁾.

Por otro lado, el CCI del equipo QUANTA LYSER 2 se basa en la determinación de anticuerpos anti-CCP en material control de tres niveles: control negativo, control positivo débil y control positivo fuerte. El coeficiente de variación obtenido no supera el 15% (tabla 4), indicando una precisión regular.

Para la implementación de nuevas herramientas diagnósticas el laboratorio clínico debe abocarse a la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de AR, en especial a aquellos que se ha desarrollado intensivamente en los últimos 5 años ^(51,52,53). En este sentido, la detección de autoanticuerpos, incluyendo anti CarP se realiza principalmente mediante técnicas inmunoquímicas tales como ELISA u otros inmunoensayos, que son metodologías ampliamente utilizadas en el HGF.

Debido a la similitud estructural entre los anti CCP y anti CarP, es necesario prestar atención a los antígenos que se encuentran adsorbidos en la fase sólida, demostrándose la posibilidad de generar una reacción cruzada ⁽⁵⁴⁾. A partir de esto, se ha investigado acerca de nuevos posibles antígenos para ser fijados a la microplaca y que aumenten la especificidad analítica de anti CarP, refiriendo a la albúmina carbamilada como la mejor opción ⁽⁵⁴⁾. Sin embargo, los estuches comercialmente disponibles para la detección de estos autoanticuerpos no especifican el tipo de antígeno asociado a la microplaca, ^(36,37,38) siendo un gran factor a considerar al momento de adquirir un nuevo método diagnóstico.

La selección de un estuche debe ser acorde a las técnicas implementadas en el laboratorio clínico. Como se ha mencionado anteriormente, la detección de anticuerpos en suero se hace mediante técnica inmunoenzimática, por lo que el mercado ofrece ELISA convencional y ELISA tipo sándwich. Los estuches seleccionados y que se muestran en la

tabla 5, están acorde al equipamiento disponible en el HGF por la característica de ser programable.

Si bien los aspectos técnicos no deben descuidarse, el fin último de realizar una medición en el laboratorio clínico, reside en su utilidad frente al diagnóstico de una patología, y para ello hay indicadores que evalúan la especificidad y sensibilidad diagnóstica ⁽²⁶⁾.

El año 2010, se incorporó la determinación de Anticuerpos anti-CCP utilizándose como complemento a la información clínica otorgada por el Factor Reumatoide ⁽⁴³⁾, ya que éste presentaba una baja especificidad diagnóstica para AR. A pesar de la adición de los anti-CCP en las guías clínicas de AR, en la actualidad se desarrollan investigaciones que buscan un biomarcador útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad, sobretodo en el grupo de pacientes anti-CCP negativos ^(20,56).

El estudio de diversas modificaciones post-transcripcionales han formado la base para el descubrimiento de nuevas herramientas diagnósticas ⁽³²⁾. Se ha evidenciado la presencia de diversos autoanticuerpos en suero de pacientes con AR, los cuales reconocen diversas proteínas, propias del organismo, que presentan cambios estructurales. Cabe decir que, en este grupo de autoanticuerpos, además de anti-CCP otros autoanticuerpos pueden ser detectados en suero de pacientes con AR, por ejemplo, los anticuerpos anti proteína carbamilada (anti-CarP) y anti proteína acetilada.

Los anticuerpos anti proteína acetiladas son un biomarcador reciente, descubierto el año 2016 por Juarez et.al, siendo determinados mediante ensayos inmunométricos utilizando vimentina acetilada para la captura del anticuerpo. Con este método se detectaron estos autoanticuerpos en el suero de pacientes con AR, presentándose en alrededor de un 40% de los casos ⁽²²⁾. Sin embargo, al ser un descubrimiento reciente, la información científica aún es poco desarrollada.

Por otro lado, los anti CarP han sido uno de los nuevos autoanticuerpos más estudiados para AR. Estudios indican que los anti CarP han sido detectados en el grupo de pacientes anti CCP negativos ^(20, 53) lo que alienta a pensar, que, si esta metodología se integra a la rutina del laboratorio clínico, se podría detectar pacientes con AR que hoy en día no están recibiendo tratamiento oportuno. En suma, de lo anterior, se ha demostrado la capacidad de anti CarP en la predicción del daño articular y su relación con la conversión de artralgia a AR ⁽²⁰⁾, información que se debe considerar dentro de su utilidad clínica a pesar de presentar una sensibilidad menor a los biomarcadores actuales.

De esta manera, el presente trabajo de evaluar aspectos técnicos de las pruebas de laboratorio para diagnóstico de Artritis Reumatoide permitió objetivar que el desempeño analítico en la detección de FR y anti CCP, al menos en los aspectos analizados, es satisfactorio, considerando las condiciones propias de un inmunoensayo. A su vez establece el marco teórico para justificar la propuesta de un nuevo biomarcador a implementar en el laboratorio de Inmunología del HGF.

CONCLUSIONES.

La Sección de Inmunología del Hospital Dr. Gustavo Fricke realiza de manera apropiada pruebas de laboratorio para el diagnóstico de Artritis Reumatoide, pero esta labor puede ser mejorada con la implementación de un nuevo marcador.

Los equipos IMAGE[®] 800 y QUANTA LYSER[®] 2, con sus métodos automatizados para la detección de Factor Reumatoide y Anticuerpos anti-CCP, respectivamente, mostraron un desempeño analítico apropiado, y acorde con las especificaciones de cada fabricante.

Con la finalidad de sistematizar la revisión periódica de los datos del desempeño analítico se propone implementar también un registro de las calibraciones.

De los nuevos biomarcadores para diagnóstico de AR, la determinación de anticuerpos anti-proteínas carbamiladas es el más prometedor, si bien la Sección de Inmunología del HGF tiene la infraestructura y la experiencia para realizar estas determinaciones, este estuche diagnóstico no está disponible en Chile aún.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Scott D, Wolfe F, Huizinga T. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 376: 1094-1108.
2. Belluci E, Terenzi R, La Paglia G, Gentileschi S, Tripoli A, Tani C, Alunno A. 2016. On year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 34:793-801.
3. Huffman K, Jessee R, Andonian B, Davis B, Narowski R, Huebner J, Kraus V, McCracken J, Gilmore B, Tune K, Campbell M, Koves T, Muoio D, Hubal M, Kraus W. 2017. Molecular alterations in skeletal muscle in rheumatoid arthritis are related to disease activity, physical inactivity, and disability. *Arthritis Res Ther*. 19:12.
4. Departamento de Salud Pública, Escuela de Medicina. 2007. Informe Final Estudio de Carga de Enfermedad y Carga Atribuible (Internet). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. Recuperado de: http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/cargaenf2008/Informe%20final%20carga_Enf_2007.pdf
5. Ministerio de Salud de Chile. 2014. Guía Clínica AUGE “Artritis Reumatoide”. Santiago de Chile.
6. López F, González C, Monteagudo I, Carreño L. 2002. Autoanticuerpos en la artritis reumatoide. *Rev Esp Reumatol*. 1: 1-76.
7. Abumohor, P. 2005. Interpretación del Laboratorio en Reumatología. Tesis de Grado, Universidad de Chile. Santiago de Chile. Recuperado de: <http://www.crreus.org/pnt/factor%20reumatoide.pdf>
8. Bennington, J. 2000. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
9. Alonso A. 2004. Técnicas de diagnóstico y tratamiento en reumatología. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
10. Dvorkin M., Cardinali D., Iermoli R. 2010. Best & Taylor Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
11. Verpoort K., Jol-van der Zijde C., Papendrecht-van der Voort, E. Ioan-Facsinay A., Drijfhout J., van Tol M., Breedveld F., Huizinga T., Toes R. 2006. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum* 54:3799-3808.

12. Martínez E., Hernández D., Núñez-Álvarez C., Cabiedes J. 2011. Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide. *Reumatol Clin.* 7;68-71.
13. Gómez A. 2004. Anticuerpos anti-péptidos citrulinados en la artritis reumatoide. *Rev Esp Reumatol*, 31:165-8.
14. Roitt I, Delves P, Martin S, Burton D. 2008. *Inmunología: Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
15. Demoruelle M., Deane K. 2013. Antibodies to citrullinated protein antigens (ACPAs): Cyclical and pathophysiologic significance. *Curr Rheumatol Rep.* 13:421-430.
16. Lakos G, Soos L, Fekete A, Szabo Z, Zeher, M, Horvath I, Dankó K, Kapitány A, Gyetvai A, Szegedi G, Szekanecz Z. 2008. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol.* 26:253-260.
17. Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Rönnelid J, Rantapää-Dahlqvist S. 2011. Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 13: 13.
18. Manzo M. 2017. Determinación del desempeño analítico del método de detección de anticuerpos anti-CCP en pacientes con artritis reumatoide en el Hospital Gustavo Fricke de Viña del Mar. Tesis de Grado, Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.
19. Fernández C, Mazziotta D. 2005. *Gestión de la calidad en el laboratorio clínico*. Editorial Médica Paramericana. Madrid, España.
20. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden M, Janssen G, van Veelen P, Levarht N, van der Helm-van Mil A, Cerami A, Huizinga T, Toes R, Trouw L. 2011. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci USA.*108:17372-7
21. Trouw L, Rispens T, Toes R. 2017. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 13: 331-339.
22. Juarez M, Bang H, Hammar F, Reimer U, Dyke B, Sahbudin I, Buckley C, Fisher B, Filer A, Raza K. 2016. Identification of novel antiacetylated vimentina antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 75: 1099-1107
23. Bases de Datos PubMed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
24. Bases de Datos EBSCO. <https://www.search.ebscohost.com>
25. Indicador de Calidad e Impacto Scimago. <https://www.scimagojr.com/>

26. Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J. 1998. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Editorial Reverté. España.
27. Beckman Coulter. 2016. Manual de Operación: Sistema Inmunoquímico IMAGE® 800. Estados Unidos.
28. Inova Diagnostics. 2015. QUANTA Lite® CCP3.1 IgG/IgA ELISA. Estados Unidos.
29. Siachoque H. 2006. Inmunología: Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio. Centro Editorial Universidad del Rosario. Colombia.
30. BIO-RAD. 2017. Liquicheck™ Immunology Control Levels 1, 2 and 3 (Lotes 66350, 66370, 66380). Estados Unidos.
31. Trouw L, Mahler M. 2012. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 12:318-22.
32. Van der Woude D, Toes R. 2017. The contribution of autoantibodies to post-translationally modified proteins to inflammatory arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 29: 195-200.
33. Rogier, R., Koenders, M. I., and Abdollahi-Roodsaz, S. 2015. Toll-like receptor mediated modulation of T cell response by commensal intestinal microbiota as a trigger for autoimmune arthritis. *J. Immunol. Res.* 2015:527696.
34. Cayman Chemical. Carbamylated Fetal Calf Serum. <https://www.caymanchem.com/product/21097>
35. Abcam. Carbamylated Bovine Serum Albumin protein (ab172196). <https://www.abcam.com/carbamylated-bovine-serum-albumin-protein-ab172196.html>
36. MyBioSource. Human Anti-carbamylated Protein Antibody ELISA kit. <https://www.mybiosource.com/human-elisa-kits/anti-carbamylated-protein-antibody/7253927>
37. Sincere Biotech Co. Anti-carbamylated Protein Antibody (ACPAb) ELISA Kit. <http://www.sincerebio.com/Product/9043711715.html>
38. Novatein Biosciences. Human Anti-Carbamylated Protein Antibody ELISA Kit. <http://www.novateinbio.com/human-elisa-kits/1156325-human-anti-carbamylated-protein-antibody-elisa-kit.html>
39. Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. 2014 Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity.*
40. Chatfield S, Wicks I, Sturgess A, Roberts L. 2009. Anti-citrullinated peptide antibody: death of rheumatoid factor? *Med J Aust.* 190:693-5

41. Avouac J, Gossec L, Dougados M. 2006. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis.* 65:845-851.
42. Shi J, van Steenbergen W, van Nies J, Lehart E, Huizinga T, van der Helm-van Mil A, Toes R, Trouw L. 2015. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 17: 339.
43. Aletaha D, Neogi T, Silman A, et al. 2010. The 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62: 2569-81.
44. García P. 2002. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. *Rev Chil Infectol.* 19: 96-100.
45. Harris D. 2001. *Análisis Químico Cuantitativo.* Editorial Reverté. España.
46. Rubio F, García B, Romero R. 2016. *Técnicas de Inmunodiagnóstico.* Ediciones Parainfo, España.
47. Hernández L, González C. 2002. *Introducción al análisis instrumental.* Editorial Ariel. España.
48. Westgard J. 2003. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem.* 40: 593-611.
49. Fernández C, Mazziota D. 2005. *Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico.* Editorial Médica Panamericana. España.
50. Gella F. 2005. *Control de la Calidad en el Laboratorio Clínico.* BioSystems. España.
51. Regueiro C, Nuño L, Ortiz A, Peiteado D, Villalba A, Pascual-Salcedo D, Martínez-Feito A, González Alvaro I, Balsa A, González A. 2017. Value of Measuring Anti-Carbamylated Protein Antibodies for Classification on Early Arthritis Patients. *Nature Sci Rep.* 7: 12023.
52. Gan R, Trouw L, Shi J, Toes R, Huizinga T, Demoruelle M, Kolfenbach J, Zerbe G, Deane K, Edison J, Gilliland W, Norris J, Holers V. 2015. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *J Rheumatol.* 42: 572-579.
53. Pecani A, Alessandri C, Romana F, Priori R, Riccieri V, Di Franco M, Ceccarelli F, Colasanti T, Pendolino M, Mancini R, Truglia S, Barbati C, Vomero M, Sabatinelli D, Morello F, Valesini G, Conti F. 2016. Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with

- rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 18: 276.
54. Verheul M, van Veelen P, van Delft M, de Ru A, Janssen G, Rispens T, Toes R, Trouw L. 2018. Pitfalls in the detection of citrullination and carbamylation. *Autoimmun Rev.* 17: 136-141.
55. Nakabo S, Hashimoto M, Ito S, Furu M, Ito H, Fujii T, Yoshifuji H, Imura Y, Nakashima R, Murakami K, Kuramoto N, Tanaka M, Satoh J, Ishigami A, Morita S, Mimori T, Ohmura K. 2017. Carbamylated albumin is one of the targets antigens of anti-carbamylated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 56: 1217-1226.
56. Trouw L, Mahler M. 2012. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 12: 318-22.

ANEXO 1.

Fórmulas:

- Límite de Detección (L.D.):

$$(1) Y = 3DE_{control\ negativo} + Promedio_{control\ negativo}$$

$$(2) Y = 0,0307x^{0,7426}$$

- Límite de Cuantificación (L.C.):

$$(1) Y = 10DE_{control\ negativo} + Promedio_{control\ negativo}$$

$$(2) Y = 0,0307x^{0,7426}$$