

INTENCIÓN DE USO

La determinación Cuantitativa de Anticuerpos de Tiroglobulina (Tg) en suero humano o plasma por Inmunoensayo de Quimioluminiscencia (CLIA). La medición de anticuerpos de TG puede ayudar en el diagnóstico de ciertas enfermedades de la tiroides tales con la de Hashimoto y la de Grave, así como goiter no toxico.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Anticuerpos de Tiroglobulina han demostrado estar presentes característicamente en pacientes con tiroiditis y tirotoxicosis primaria. Lo que ha llevado a la medición clínica a ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de disfunción de la tiroides. En el pasado métodos de Hemoaglutinaciones pasivos (PHA) eran utilizados para la medición de anticuerpos de Tg. Las pruebas PHA no tienen la sensibilidad del inmunoensayo enzimático y estaban sujetos a interpretaciones subjetivas.

Anticuerpos de TG comúnmente están presentes en pacientes con enfermedad de Tiroides Autoinmune. Aproximadamente 10 por ciento de individuos sanos tienen anticuerpos de Tg a niveles bajos; Concentraciones más altas son encontradas en 30 y 80 % de pacientes con enfermedad de Grave y con Tiroiditis de Hashimoto respectivamente. La presencia de anticuerpos de Tg produce falsos resultados en la determinación de niveles de Tg en ensayos competitivos e inmunoensayos tipo sándwich.

El ensayo de Quimioluminiscencia de microplaca le otorga al operador con una sensibilidad óptima con la menor manipulación técnica. En este método, el suero de referencia, el espécimen del paciente diluido o el control son los primeros en ser añadidos al pocillo de la microplaca. Tiroglobulina biotilataada (Tg) es añadido, y luego los reactantes son mezclados. La reacción resulta de los auto anticuerpos de Tg y el Tg biotilataado para formar un complejo inmune, el cual es depositado en la superficie de los pocillos recubiertos de streptavidin debido a la alta afinidad para reaccionar de biotin y streptavidin.

Después de ser completado el periodo requerido de incubación, la aspiración o decantación separa los reactantes que no se adhieren al pocillo. Una enzima anti-humana IgG conjugada es añadida para permitir la cuantificación de la reacción a través de la interacción de IgG humano y el complejo inmune. Después del lavado la actividad enzimática es determinada por la reacción con el sustrato para producir luz.

El empleo de varias referencias de suero de actividad de anticuerpos conocida permite la construcción de una gráfica de actividad de las enzimas y de los anticuerpos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los reactivos requeridos para un ensayo CLIA secuencial incluyen, antígeno inmovilizado, auto-anticuerpo circulante y anticuerpo específico de enzimas relacionadas. En este procedimiento la inmovilización ocurre durante el ensayo en la superficie del pocillo del micro placa a través de la interacción de streptavidin que recubre los pocillos y el antígeno biotilataado de Tiroglobulina añadido.

Después de mezclar el antígeno biotilataado y el suero conteniendo el auto-anticuerpo, la reacción resulta entre el antígeno y el anticuerpo para formar un complejo inmune.

Un conservador ha sido añadido a la solución. Almacenar de 2- 30°C (ver sección de preparación del Reactivo)

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pocillo debido a la gran afinidad reactiva del streptavidin y el antígeno biotilataado. Después del tiempo de incubación, el pocillo es lavado para separar los componentes no adheridos por aspiración o por decantación. La enzima de anticuerpo específica es entonces añadida (anti-h-IgG) a los micro posos. El conjugado se une al complejo inmune que se ha formado.

La enzima conjugada que se une al complejo inmune en una segunda incubación es separada del material sin reacción mediante un proceso de lavado. La actividad de la enzima, determinada por la reacción con el sustrato que genera luz, en esta fracción es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo en el espécimen. Utilizando varios sueros referenciales diferentes de actividades conocidas de anticuerpo, una curva de referencia puede ser generada, con la cual la actividad de los anticuerpos de un desconocido puede ser asumida.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Pipeta de 10 µl y 25 µl
2. Pipetas multicanal apropiadas de 100 y 1000 µl
3. Lavadora de microplaca (opcional)
4. Luminómetro para microplaca.
5. Tubos de ensayo para dilución de la muestra del paciente y los reactivos señalizadores.
6. Papel absorbente
7. Película plástica o cubierta de microplaca para los periodos de incubación.
8. Aspiradora para los pasos de lavado.
9. Cronómetro.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Plato con 96 micropozos
2. Enzima conjugada (2 viales/ 6 ml)
3. Estándares de referencia: 0.2, 10.6, 42.5, 85,170 y 340 IU/ml.
4. Buffer de lavado 2 bolsas
5. Diluyente de La muestra (2 frascos/50 ml)
6. Sustrato A 6 ml
7. Sustrato B 6 ml
8. Control 1 liofilizado (1ml)
9. Control 2 liofilizado (1ml)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso In Vitro Solamente
2. NO debe de utilizarse en humanos o animales interna o externamente.
3. Este producto puede contener suero humano y ha sido probado como no reactivo a Hepatitis B, VIH 1 y anticuerpos de HCV por procedimientos especificados por la FDA. Debido a que ninguna prueba puede ofrecer seguridad total porque está libre de agentes infecciosos, todos los productos derivados del suero deben de ser tratados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Recolecte la muestra por punción en la vena en tubos de 6 ml libres o conteniendo EDTA y Heparina. Todas las precauciones deben de ser tomadas al extraer la sangre. Separe las células rojas por centrifugación y utilice el suero o el plasma para el procedimiento anti Tg. Los especímenes pueden ser refrigerados a 2-8°C por un lapso no mayor a 48 horas. Si el espécimen no puede ser utilizado dentro de las 48 horas, este puede ser congelado a temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Cuando se realiza la prueba por duplicado, se requieren 0.100 ml del espécimen diluido.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Buffer de lavado

Diluya el concentrado en 500 ml de agua destilada o desionizada en un recipiente apropiado. Almacene a temperatura 2 – 8°C.

Dilución de Muestra

Dispense 0.010 ml (10 µl) de cada espécimen en 1 ml de diluyente de suero. Cubra y gire o mezcle por inversión. Almacénesse a 2-8°C hasta por 48 horas.

NOTAS IMPORTANTES

1. No utilice los productos después de la fecha de caducidad
2. Los reactivos abiertos son estables por 60 días, si son conservados a 2 – 8°C.

Calibrator Anti-TG	Concentration (IU/ml)
A	5
B	62.5
C	250
D	500
E	1000
F	2000

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de empezar con el ensayo, lleve todas las muestras, reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20-27°C)

1. Desprenda las tiras de micropozos para cada suero de referencia, control y muestra que vaya a ser procesada. Regrese las tiras de micropozos sin usar a su bolsa de aluminio y séllela. Almacénela a 2-8°C.
2. Pipetee 100 µl del suero de referencia, control o muestra diluido en el micro pozo asignado.
3. Agite la microplaca suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cúbrala.
4. Incube por 30 minutos a temperatura 37°C
5. Deseche los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta seque la placa con papel absorbente.
6. Agregue 350 µl de Solución Buffer de Lavado (Vea preparación del reactivos) decante, o aspire. Repita el procedimiento 4 veces más (Total 5 veces). Una lavadora automática puede ser usada. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado.
7. Agregue 0.100 ml (100 µl) reactivo enzima conjugada anti-Tg rastreador a todos los pocillos. Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo en la reacción entre los pocillos.
8. Incube por 30 minutos a temperatura 37°C.
9. Repita paso 5.
10. Repita paso 6.
11. Agregue 0.100 ml (100 µl) reactivo mixto sustrato A - B anti-Tg rastreador a todos los pocillos. Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo en la reacción entre los pocillos.
12. Incube a temperatura ambiente por 5 minutos en la oscuridad.
13. Lea los RLU's en cada pocillo con un Luminómetro por lo menos por 0.2 segundos por micropocillo. Los resultados pueden leerse dentro de 30 minutos después de añadir la solución sustrato.

NOTA: para re-ensayar los especímenes con concentraciones mayores a 2000 IU/ml, diluya la muestra un adicional de 1:5 o 1:10 usando el material originalmente diluido. Multiplique por el factor de dilución para obtener la concentración del espécimen.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe de ensayar y establecer sus intervalos de referencia para controles clínicos relevantes y monitorear el desempeño del ensayo. Estos controles deben de ser tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento realizado. Lleve graficas de control de calidad para seguir el desempeño de los reactivos provistos.

PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para que los resultados del ensayo puedan ser tomados como válidos, deben de cumplir los siguientes criterios.

1. La Curva de Respuesta de Dosis debe de estar dentro de los parámetros establecidos.
2. Cuatro de seis pruebas de control de calidad deben de estar dentro de los rangos establecidos.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Una curva de referencia es usada para acertar la concentración de Tg (x-Tg) en especímenes desconocidos.

1. Registre los RLU's obtenidos de la impresión del Luminómetro para microplaca.
2. Plasme la media de RLU's para cada referencia de suero duplicada contra la actividad correspondiente de x-Tg en IU/ml en papel para graficar.
3. Dibuje la curva sobre los puntos plasmados.
4. Para determinar la concentración de x-Tg para un desconocido. Localice el promedio de RLU'S para cada desconocido en el eje vertical de la gráfica, encuentre el punto de intersección en la curva y la concentración (en µIU/ml) del eje horizontal de la gráfica (los duplicados del desconocido pueden ser promediados como se indicó) En el siguiente ejemplo, el promedio de RLU's (77755) cruza la curva de calibración en 1403IU/ml de la concentración x-Tg.

VALORES DE REFERENCIA

Un estudio de población normal fue realizado para determinar los resultados esperados de Anti- TG CLIA. El número (n), la media (x) y la desviación estándar (δ) son expuestas en la tabla 1. Calores excedidos de 40IU/ml son considerados como positivos para la presencia de anticuerpos anti- TG.

PERFORMANCE

1. Precisión:

La precisión de este ensayo fue determinada por el análisis de tres diferentes sueros de control con diferentes niveles. El número, media, desviación estándar, y coeficiente de variación de cada uno de estos controles se presentan en la tabla 2 y 3.

TABLA 2
Precisión Intra-ensayo (Valores en IU/MI)

Muestra	Número	Media	S.D	C.V %
C1	20	63.3	3.3	5.2%
C2	20	224.3	14.5	6.5%
C3	20	1,498.1	67.4	4.5%

TABLA 3
Precisión Inter-ensayo (Valores en IU/MI)

Muestra	Número	Media	S.D	C.V %
C1	10	67.0	5.7	8.5%
C2	10	237.6	18.5	7.8%
C3	10	1518.3	78.4	5.2%

2. Exactitud:

Este dispositivo fue comparado con un microplaca de referencia para anti - Tg ELISA. Especímenes biológicos de población normal y en estado de enfermedad fueron usados. Los estados de enfermedad incluidos son Tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Grave, Nódulos tiroideos así como carcinoma tiroidal. El total de especímenes fueron 122. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Método	Media	Análisis	Coefficiente de relación	Referencia
Este	1387.6	$y = 11 \cdot +0.99(x)$	0.992	404.2

3. Sensibilidad:

La sensibilidad del dispositivo es de 5.0 IU/ml

4. Especificidad:

Interferencia de ANA, DNA, Peroxidasa Tiroidea TPO y anticuerpos reumatoides, resultado insignificante para el método de ensayo.

REFERENCIAS

1. Chopra IJ, Ho RS, Lam R. An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum: its application to clinical and physiological studies. J. Lab. Med. 1972; 80(5): 729-739.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test. Ann. Clin. Biochem. 1997; 34(Pt 6): 579-581.
3. Santini F, Pinchera A, Ceccarini G, et al. Evidence for a role of the type III-iodothyronine deiodinase in the regulation of 3,5,3'-triiodothyronine content in the human central nervous system. Eur. J. Endocrinol. 2001; 144(6): 577-583.
4. Nikkilä EA, Kekki M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. J. Clin. Invest. 1972; 51(8): 2103-2114.