

## INTENCIÓN DE USO

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

## RESUMEN Y APLICACIÓN

TPO es una enzima expresada principalmente en la tiroides que libera yodo para adición de residuos de tirosina sobre la tiroglobulina para la producción de T4 (Tiroxina) o T3 (triyodotironina), hormonas tiroideas. En humanos, La tiroperoxidasa está codificada por el gen TPO. Anticuerpos contra la tiroides peroxidasa han demostrado ser característicamente presente de los pacientes con tiroiditis de Hashimoto (95%), miedema idiopático (90%) y graves enfermedad (80%) 3,4 De hecho, el 72% de los pacientes positivos para la exposición Anti-TPO algún grado de disfunción tiroidea. Esto ha llevado a la medida que se convierte en una herramienta valiosa en el diagnóstico de la tiroides disfunción. Se han realizado mediciones de anticuerpos contra TPO, en por PHA (Hemaglutinación pasiva). Sin embargo, las pruebas de PHA no tienen la sensibilidad del inmunoensayo enzimático y están limitados por la interpretación. Este producto, con la sensibilidad de inmunoanálisis de quimioluminiscencia, permite la detección de niveles de anticuerpos frente a TPO. Además, los resultados se cuantifican con luminómetro, que elimina la interpretación subjetiva. El ensayo de Anti-TPO por inmunoanálisis de quimioluminiscencia es útil en la diagnóstico diferencial de la enfermedad tiroidea autoinmune

## 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 biotinilado de TPO añadido. Después de mezclar el antígeno biotinilado y el suero conteniendo el auto –anticuerpo, la reacción resulta entre el antígeno y el anticuerpo para formar un complejo inmune. Simultáneamente, el complejo es depositado en el pocillo debido a la gran afinidad reactiva del streptavidin y el antígeno biotinilado. 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.

**NOTA:** Para re-ensayar los especímenes con concentraciones mayores a 340IU/ml, diluya la muestra un adicional de 1:5 o 1:10 usando el material originalmente diluid. Multiplique por el factor de dilución para obtener la concentración del espécimen.

## 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/50ml)
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 que 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 el espécimen por punción en la vena en tubos de 10 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 plasma para el procedimiento anti-TPO. 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 0.100ml 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.

Calibrador	Anti-TPO Concentracion (IU/ml)
A	0.2
B	10.6
C	42.5
D	85
E	170
F	340

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C).

1. Use sólo el número de pocillos requeridos para cada calibrador y muestra a ensayar.
2. Añadir 100 µl de calibradores, controles o muestras diluidas a cada pocillo.
3. Agitar durante 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pozos.
4. Cubrir la placa e incubar a 37 ° C durante 30 minutos.
5. Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración y secar la placa con papel absorbente.
6. Añadir 350 µl de solución de lavado a cada pocillo, decantar o aspirar. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Al final del lavado, invertir la placa y extraer cualquier solución de lavado residual con papel absorbente.
7. Añadir 100 µl de Conjugado Enzimático a cada pocillo.
8. Repita el paso 5.
9. Repita el paso 6.
10. Añadir 100 µl de la solución de sustrato mixto a cada pocillo. Coloque la microplaca en la cámara de detección de un luminómetro durante 5 minutos, luego lea el valor de RLU de cada pozo.

## 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 TPO (x-TPO) en un espécimen desconocido.

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-TPO en IU/ml en papel para graficar.
3. Dibuje la curva sobre los puntos plasmados.
4. Para determinar la concentración de x-TPO 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  $\mu\text{IU/ml}$ ) 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 (78755) cruza la curva de calibración en 316IU/ml de la concentración x-TPO.

## VALORES DE REFERENCIA

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

## 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	9.1	0.8	8.8%
C2	20	55.7	3.8	7.0%
C3	20	121.8	7.5	6.2%

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

Muestra	Número	Media	S.D	C.V %
C1	10	8.5	1.0	11.8%
C2	10	54.7	4.8	8.8%
C3	10	124.5	10.2	8.1%

### 2. Exactitud:

Este dispositivo fue comparado con una microplaca de referencia para anti-TPO 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 tiroidales así como carcinoma tiroidal. El total de especímenes fueron 125. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Método	Media	Análisis	Coefficiente de relación	Referencia
Este	185.3	$y = 1.02(x) - 6.5$	0.986	192.3

### 3. Sensibilidad:

La sensibilidad del dispositivo es de 1.0 IU/ml

### 4. Especificidad:

Interferencia de ANA, DNA, Peroxidasa Tiroidea TPO y anticuerpos reumatoides, resulto 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.