



COD 44796 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos anti-tiroglobulina (anti-Tg) Sólo para uso "in vitro" en el laboratorio clínico

ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA (anti-Tg) Enzimoinmunoanálisis en microplaca

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos contra la tiroglobulina (Tg) presentes en el suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con un anticuerpo anti-IgG humanas conjugado con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂, que al ser degradada por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido sulfúrico y la formación de producto se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción¹.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Tampón de Lavado Concentrado.** 50 mL. Tampón Tris 2 mol/L, detergente no iónico 22 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. Diluyente de Muestra.** 125 mL. Tampón Tris 0,1 mol/L, cloruro de sodio 10 mmol/L, albúmina bovina 5 g/L, detergente no iónico 5 g/L, azida de sodio 15 mmol/L, pH 7,4. Coloreado azul.
- C+. Control Positivo.** 1 mL. Listo para su uso. Suero con anticuerpos anti-Tg, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 2 mL. Suero negativo para anticuerpos anti-Tg, azida de sodio 15 mmol/L.
- D. Conjugado.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa. Coloreado amarillo.
- E. Sustrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
- M. Microplaca:** 96 pocillos de separables individualmente recubiertos con Tg humana. Color amarillo.
- S1-S6. Patrones Anti-Tg,** calibrados frente al Patrón Internacional OMS, cód. 65/93. 1 mL, listos para su uso. Suero anti-Tg, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos anti-Tg son 0, 30, 100, 300, 1000 y 3000 IU/mL, según se indica en la etiqueta.

Los sueros humanos utilizados en la preparación de los patrones, del control negativo y el control positivo son negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los patrones y los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microplaca (M): Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras en la base del pocillo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de Lavado. Efectuar una dilución 1/20 del Tampón de Lavado Concentrado (A) con agua destilada y mezclar. Se necesitan aproximadamente 50 mL de Tampón de Lavado para el lavado de una tira. Una vez diluido, el reactivo es estable 7 días a 2-8°C. Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda.
- Aspirador multicanal o lavador automático de microplacas.
- Lector de microplacas o fotómetro con microcubeta con filtro de 450 ± 10 nm.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/200 en Diluyente de Muestra (B) antes del ensayo.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente.
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y sacar la cantidad necesaria de pocillos a utilizar (Nota 1).
3. **Determinación cuantitativa:** Pipetear 100 µL de cada uno de los patrones (S1-S6), Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos.
4. **Determinación cualitativa:** Pipetear 100 µL de Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) y muestras diluidas en distintos pocillos. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra (B) para el blanco.
4. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido y lavar los pocillos con 300 µL de Tampón de Lavado durante unos 10 segundos 4 veces (Notas 2 y 3).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos como en el paso 4.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar las tiras durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 4).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón 0 IU/mL (S1) o el blanco para el ajuste a 0. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinación cuantitativa. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Patrones frente a sus respectivas concentraciones de anticuerpos anti-Tg (IU/mL). La concentración de anticuerpos anti-Tg en la muestra se calcula por interpolación en la curva de calibración.

Determinación cualitativa. Calcular la absorbancia del Valor Discriminante aplicando la siguiente fórmula:

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} \text{ Control Positivo} \times \text{Factor}$$

El valor del factor (F) viene indicado en la etiqueta del Control Positivo.

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de absorbancia} = \frac{A_{450\text{ nm}} \text{ de la Muestra}}{A_{450\text{ nm}} \text{ del Valor Discriminante}}$$

Cuando se obtengan valores de absorbancia por encima del límite superior del rango del lector de microplacas, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la operación.

VALORES DE REFERENCIA

Se consideran positivas las muestras con concentraciones superiores a 140 IU/mL o con razón de absorbancia > 1,4.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 100 IU/mL o con razón de absorbancia < 1,0.

Las muestras con concentraciones comprendidas entre 100 y 140 IU/mL o con razones comprendidas entre 1,0 y 1,4 deben considerarse dudosas y se recomienda la repetición del ensayo o la determinación de parámetros alternativos de valor diagnóstico.

Estos valores se dan únicamente a título orientativo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El valor de absorbancia del Patrón 0 IU/mL (S1) debe ser inferior o igual a 0,4.

La concentración del Control Positivo (C+) debe estar comprendida entre 400 y 600 IU/mL y la del Control Negativo (C-) debe ser inferior a 100 IU/mL.

La razón de absorbancia para el Control Positivo (C+) debe ser > 1,4 y para el Control Negativo (C-) debe ser < 1,0.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	CV	n
363 IU/mL	3 %	25
119 IU/mL	7 %	25

– Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
363 IU/mL	4 %	25
119 IU/mL	8 %	25

– Límite de detección: 4,7 IU/mL

– Intervalo de medida: 1 – 3000 IU/mL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la medición.

– Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

– Interferencias: El factor reumatoide (300 IU/mL) no interfiere. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los anticuerpos anti-Tg están presentes típicamente en pacientes con enfermedad de Hashimoto (80-90% de los pacientes), mixedema primario (80%), enfermedad de Graves (50-70%), diabetes mellitus de tipo I (40%) y en mujeres embarazadas (14%)^{3,4}. Igualmente aparecen títulos altos de anticuerpos en cáncer de tiroides diferenciado, aunque no tienen valor clínico³. También, junto con anticuerpos anti-TPO, se detectan en otras enfermedades: bocio endémico, tiroiditis subaguda, enfermedad de Addison, autoinmunopatías poliendocrinas y en miembros de familias propensas a autoinmunidad específica de órgano. Sin embargo, también pueden estar presentes en un 5-20% de individuos sanos.^{3,5,6}

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta únicamente el resultado del ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
2. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
3. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
4. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que debe pipetarse en los pocillos siguiendo el mismo orden y a los mismos intervalos de tiempo con que se inició la reacción pipeteando el Sustrato (E) en el paso 9.

BIBLIOGRAFÍA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Howard GC ed. *Methods in Nonradioactive Detection*. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Press, 1997.
3. Burek CL, Rose NR. Thyroglobulin autoantibodies. En: Peter JB, Shoenfeld Y. *Autoantibodies*. Elsevier. Amsterdam, 1996; 810-815
4. Høier-Madsen M, Feldt-Rasmussen U, Hegedüs L, Perrild H, Hansen HS. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of thyroglobulin autoantibodies. *Acta Pathol Microbiol Scand (C)* 1984; 92:377-382
5. Feldt-Rasmussen, U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996; 42:160-163
6. Herold KC, Sarne DH. Autoimmune endocrine disorders. En: Lahita RG ed. *Textbook of the autoimmune diseases*, 1ª edición. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2000; 377-406