

Anti-Tg

(Anti-Tiroglobulina)

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de anticuerpos contra tiroglobulina en suero humano. La determinación de anti-Tg se utiliza como ayuda en la detección de enfermedades tiroideas autoinmunes.

Resumen: 1-6

La tiroglobulina (Tg) se produce en la glándula tiroidea y es un componente principal en la luz del folículo tiroideo. En sinergia con la enzima peroxidasa específica de tiroidea (TPO), La Tg tiene una función esencial en la yodación de L-tirosina y en la formación de las hormonas tiroideas T4 y T3. Tanto la Tg como la TPO son potencialmente autoantigénicas.

Se encuentran concentraciones séricas elevadas de anticuerpos contra Tg (autoanticuerpos Tg) en sujetos con tiroiditis autoinmune. Las concentraciones altas de anti-Tg junto con anti-TPO son indicativas de tiroiditis infiltrativa linfocítica crónica (enfermedad de Hashimoto). La frecuencia de anticuerpos anti-tiroglobulina es de aproximadamente 70-80 % en sujetos con tiroiditis autoinmune, incluida la enfermedad de Hashimoto, y de aproximadamente 30 % en individuos con enfermedad de Graves. El ensayo anti-Tg es importante para monitorear el curso de la tiroiditis de Hashimoto y para el diagnóstico diferencial (casos de sospecha de tiroiditis autoinmune de origen desconocido con prueba anti-TPO negativa, enfermedades graves sin infiltración linfocitaria, y para descartar interferencia por autoanticuerpos Tg en la prueba Tg).

Aunque la sensibilidad del procedimiento se puede aumentar mediante la determinación simultánea de anticuerpos tiroideos adicionales (anti-TPO, TSH-receptor-anticuerpos), un resultado negativo no descarta definitivamente la presencia de una enfermedad autoinmune. El nivel del título de anticuerpos no se correlaciona con la actividad clínica de la enfermedad. Los títulos que inicialmente están elevados pueden volverse negativos si la enfermedad persiste durante un período de tiempo más largo o si se produce la remisión. Si reaparecen los anticuerpos después de la remisión, es probable que haya una recaída.

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas utilizan antígenos humanos y anticuerpos IgG antihumanos de conejo (anti-IgG).

Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 70 minutos.

El Anti-TG ELISA emplea el método ELISA indirecto de fase sólida para la detección de anticuerpos contra TG en un procedimiento de incubación de dos pasos. Las tiras de micropocillos de poliestireno están recubiertas previamente con antígenos TG humanos altamente inmunorreactivos. Durante el primer paso de incubación, los anticuerpos específicos anti-TG, si están presentes, se unirán a los antígenos TG preincubados en fase sólida. Los pocillos se lavan para eliminar las proteínas séricas no unidas y se añaden anticuerpos IgG anti-humanos de conejo (anti-IgG) conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP-Conjugado). Durante el segundo paso de incubación, estos anticuerpos conjugados con HRP se unirán a cualquier complejo de antígeno-anticuerpo (IgG) formado previamente y el conjugado de HRP no unido se eliminará mediante lavado. Las soluciones de cromógeno que contienen tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de urea se agregan a los pocillos y, en presencia del inmunocomplejo antígeno-anticuerpo-anti-IgG (HRP), los cromógenos incoloros son hidrolizados por el conjugado de HRP unido a un producto de color azul. El color azul se vuelve amarillo después de detener la reacción con ácido sulfúrico.

La cantidad de intensidad de color se puede medir y es proporcional a la cantidad de anticuerpo capturado en los pocillos y a la cantidad de anticuerpo en la muestra, respectivamente.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos. Recubierta previamente con antígeno TG humano.
- Calibradores, 6 viales de 1 mL cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11,0 ml de anticuerpos IgG anti-humanos de conejo marcados con HRP (peroxidasa de rábano picante) (anti-IgG) en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina sérica bovina). Contiene 0,1% de conservante ProClin300.
- Diluyente de Suero: 1 vial, 11mL. Contiene sales amortiguadoras y un colorante.
- Solución de lavado concentrada, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Sustrato, 1 vial, 11ml, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 ml de ácido sulfúrico 1 mol/l.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua destilada

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.
- Asegúrese de que todos los reactivos estén dentro de la validez indicada en la caja del kit y del mismo lote. Nunca use reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas o cajas.
- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice el ensayo lejos de malas condiciones ambientales, p.ej. aire ambiente que contenga gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos por completo. Cada pocillo debe inyectarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, no se supone que la fuerza de la inyección sea demasiado intensa para evitar el desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos en cada pocillo. Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua residuales. Se recomienda lavar la microplaca con un lavador automático de tiras de microplaca.
- Si no se elimina adecuadamente la solución adherida en los pasos de lavado por aspiración o decantación, es posible que se produzca una replicación deficiente y resultados erróneos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C.
- Coloque los pocillos sin usar en la bolsa de aluminio con cierre hermético y vuelva a calentarlos a 2-8°C, en cuyas condiciones los pocillos permanecerán estables durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.
- Selle y devuelva los calibradores sin usar a 2-8°C, bajo cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso más prolongado, almacene los calibradores abiertos en alícuotas y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas médicas correctas.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C durante no más de 8 horas. Estable durante 3 días a 2-8°C, y 1 mes a -20 °C. Recuperación dentro del 90-110 % del valor sérico o pendiente 0,9-1,1. Congelar una sola vez.
- Los tipos de muestras enumerados se analizaron con una selección de tubos de recogida de muestras que estaban disponibles comercialmente en el momento de la prueba, es decir, no se analizaron todos los tubos disponibles de todos los fabricantes. Los sistemas de recolección de muestras de varios fabricantes pueden contener diferentes materiales que podrían afectar los resultados de la prueba en algunos casos. Al procesar muestras en tubos primarios (sistemas de recolección de muestras), siga las instrucciones del fabricante del tubo. Centrifugar las muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación. Algunas muestras, especialmente las de pacientes que reciben terapia anticoagulante o trombolítica, pueden presentar un aumento del tiempo de coagulación. Si la muestra se centrifuga antes de que se forme un coágulo completo, la presencia de fibrina puede provocar resultados erróneos. Asegúrese de que las muestras no estén deterioradas antes de su uso.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.
- Tenga en cuenta que los niveles de interferencia de fibrina pueden estar presentes en muestras que no tienen partículas evidentes o visibles.
- Si no se puede verificar que la recolección y la preparación de la muestra sean adecuadas, o si las muestras se han dañado debido al transporte o la manipulación de las muestras, se recomienda un paso de centrifugado adicional. Las condiciones de centrifugación deben ser suficientes para eliminar las partículas.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.
- Ajuste la incubadora a 37°C.
- Prepare el concentrado de solución de lavado antes de la medición. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.
- No use Sustrato si se ve azul.
- No utilice reactivos que estén contaminados o que tengan crecimiento bacteriano.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo a niveles en el rango bajo, normal y elevado para monitorear el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizar un control de veracidad por separado y analizarlos junto con las muestras en la

misma serie. El resultado es válido si los valores de control se encuentran dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice únicamente el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de la microplaca para cada calibrador y muestra que vaya a analizar.
- Agregue 100 µL de calibradores a cada pocillo.
- Agregue 100 µL de Diluyente de muestra (color verde) a cada pocillo, excepto a los pocillos del calibrador.
- Agregue 10 µL de muestra a cada pozo de diluyente de muestra (NOTA: los reactivos en los pozos cambiarán de color azul a verde), luego agite durante 30 segundos.
- Cubra la placa con una tapa para placas e incube a 37 °C durante 30 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de enzima conjugada,
- Cubra la placa con una tapa para placas e incube a 37°C durante 30 minutos.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de Sustrato a cada pocillo. Cubra e incube a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad para que reaccione durante 10 minutos. No agite la placa después de agregar el sustrato.
- Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo.
- Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse de que el color azul cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usando de 620 a 630 nm como longitud de onda de referencia para minimizar las imperfecciones de los pocillos) en un lector de microplacas. Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Grafique el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en UI/mL para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal. Se sugiere el método punto a punto para generar una curva de calibración.

Los siguientes datos son solo para demostración y no se pueden usar en lugar de las generaciones de datos en el momento del ensayo

Muestra	Valor (IU/mL)	Absorbancia
Calibrador A	0	0.009
Calibrador B	50	0.152
Calibrador C	150	0.481
Calibrador D	500	1.175
Calibrador E	1000	1.923
Calibrador F	2000	2.859
Control 1	72.19	0.225
Control 2	967.91	1.875
Muestra	200.94	0.582

Limitaciones e Interferencia:

- El ensayo no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 1129 µmol/L o < 66 mg/dL), hemólisis (Hb < 1,05 mmol/L o < 1,69 g/dL), lipemia (Intralipid < 2000 mg/dL) y biotina (< 246 nmol/L o < 60 ng/mL).
- Criterio: Recuperación dentro del ± 15 % del valor inicial.
- No se deben tomar muestras de pacientes que reciben terapia con dosis altas de biotina (es decir, > 5 mg/día) hasta al menos 8 horas después de la última administración de biotina.
- No se observó interferencia de factores reumatoides hasta una concentración de 300 UI/mL.
- Se realizaron pruebas in vitro en 24 productos farmacéuticos de uso común. No se encontraron interferencias con el ensayo.
- Las concentraciones de Tg > 2000 ng/mL pueden dar lugar a concentraciones de antiTg falsamente elevadas. En consecuencia, los valores de antiTg no deben informarse para muestras de pacientes en ese caso.
- En casos raros, pueden ocurrir interferencias debido a títulos extremadamente altos de anticuerpos contra anticuerpos específicos del analito. Estos efectos se minimizan mediante un diseño de prueba adecuado.
- Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse junto con el historial médico del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

Límites y Rango de Medición:

10,0-2000 UI/mL (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección inferior se notifican como < 10,0 UI/mL. Los valores por encima del rango de medición se notifican como > 2000 UI/mL.

Límites Inferiores de Medición:

Límite inferior de detección: < 10,0 UI/mL

El límite de detección inferior representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de reproducibilidad, n = 21).

Valores Esperados:

Los estudios realizados con el ensayo Anti-Tg que cubrieron un total de 235 sujetos sanos confirmaron el valor umbral utilizado actualmente de 115 UI/mL; este valor corresponde al 94 por ciento. Por tanto, valores superiores a 115 UI/mL se consideran positivos para la presencia de autoanticuerpos anti-Tg.

No hemos estudiado los intervalos de referencia en niños, adolescentes y mujeres embarazadas. Cada laboratorio debe investigar la transferibilidad de los valores esperados a su propia población de pacientes y, si es necesario, determinar sus propios rangos de referencia.

Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

Precisión:

La precisión se determinó usando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Media IU/mL	Reproducibilidad		Precisión Intermedia	
		SD IU/mL	CV %	SD IU/mL	CV %
Suero 1	70.25	3.31	4.58	4.74	6.75
Suero 2	195.88	10.02	5.12	16.10	8.22
Suero 3	326.07	17.37	5.33	22.98	7.05
PC Universal 1	101.35	4.98	4.92	6.94	6.85
PC Universal 2	498.22	19.28	3.87	27.25	5.47

*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución.

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo anti-Tg (y) con el Beckman Coulter Access Anti-Tg (x) usando muestras clínicas arrojó las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 109

Regresión Lineal.

y = 1,0454x + 0,093

r = 0,9782

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 0 y 1900 UI/mL.

Especificidad Analítica:

En muestras que contenían hasta aproximadamente 1400 UI/ml de anti-TPO (medido con el ensayo Anti-TPO), se encontró un valor máximo de anti-Tg de 55 UI/ml.

Referencias:

1. Hörmann R. Schilddrüsenkrankheiten, Hyperthyreose, Untersuchungsschema/ Labormethoden Blackwell Wissenschafts- Verlag Berlin/Wien 1997;25.
2. Thomas L. Función tiroidea. Anticuerpos de tiroglobulina. En: Thomas L (ed.). Alemán: Labor und Diagnose. TH-Books, Fráncfort. 5ª edición 1998:1043. Inglés: Diagnóstico de Laboratorio Clínico. 1ª edición 1998:1021.
3. Feldt-Rasmussen U. Objetivos de rendimiento analítico y clínico para probar autoanticuerpos contra la tiroperoxidasa, la tiroglobulina y el receptor de tirotrópina. clin quimica 1996;42(1):160-163.
4. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, et al. Anticuerpos de tiroglobulina sérica: prevalencia, influencia en la medición de tiroglobulina sérica y significado pronóstico en pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides. J Clin Endocrin Metabol 1998;83(4):1121-1127.
5. Pautas internacionales de prueba de tiroides de Spencer C. Academia Nacional de Bioquímica Clínica, agosto de 2001; Sección 3E, 11-14.
6. Prentice L, Kiso Y, Fukuma N, et al. Autoanticuerpos monoclonales contra tiroglobulina: análisis de regiones variables y reconocimiento de epítomos. J Clin Endocrin Metabol 1995;80:977.

