

# Anti- TPO

## (Anti-Peroxidasa Tiroidea)

### Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea en suero humano. La determinación de anti-TPO se utiliza como ayuda en el diagnóstico de enfermedades tiroideas autoinmunes.

### Resumen: 1-6

La peroxidasa específica de tiroides (TPO) está presente en los microsomas de los tirocitos y se expresa en su superficie celular apical. En sinergia con la tiroglobulina (Tg), esta enzima tiene una función esencial en la yodación de la L-tirosina y el acoplamiento químico de la mono y di-yodotirosina resultante para formar las hormonas tiroideas T4, T3 y T3L.

La TPO es un autoantígeno potencial. Se encuentran títulos séricos elevados de anticuerpos contra la TPO en varias formas de tiroiditis causadas por autoinmunidad. El término "anticuerpo microsomal", que aún se encuentra con frecuencia, se origina en el momento en que la TPO aún no se había identificado como un antígeno en la autoinmunidad causada por microsomas. En el sentido clínico, los dos términos anti-TPO y anticuerpo microsomal pueden usarse como sinónimos; hay diferencias, sin embargo, con respecto a los métodos de prueba.

Se encuentran títulos altos de anti-TPO en hasta el 90 % de los pacientes con tiroiditis crónica de Hashimoto. En la enfermedad de Graves, el 70 % de los pacientes tienen un título elevado. Aunque la sensibilidad del procedimiento se puede aumentar mediante la determinación simultánea de otros anticuerpos tiroideos (anti-Tg, TSH-receptor-anticuerpo - TRAb), un resultado negativo no descarta la posibilidad de una enfermedad autoinmune. La magnitud del título de anticuerpos no se correlaciona con la actividad clínica de la enfermedad. Los títulos inicialmente elevados pueden volverse negativos después de largos períodos de enfermedad o durante la remisión. Si los anticuerpos reaparecen después de la remisión, es probable que haya una recaída. Mientras que las pruebas habituales de anticuerpos microsomales emplean microsomas no purificados como preparación de antígeno, las pruebas anti-TPO utilizan una peroxidasa purificada. Los dos procedimientos tienen un rendimiento comparable en cuanto a la sensibilidad clínica, pero se puede esperar una mejor consistencia entre lotes y una mayor especificidad clínica de las pruebas anti-TPO debido a la mayor calidad del antígeno utilizado. Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas utilizan antígenos humanos y anticuerpos IgG anti-humanos de conejo (anti-IgG).

### Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 70 minutos.

El ELISA anti-TPO emplea el método ELISA indirecto de fase sólida para la detección de anticuerpos contra la TPO en un procedimiento de incubación de dos pasos. Las tiras de micropocillos de poliestireno están recubiertas previamente con antígenos TPO humanos altamente inmunoreactivos. Durante el primer paso de incubación, los anticuerpos específicos anti-TPO, si están presentes, se unirán a los antígenos de TPO precubiertos 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 (conjugado HRP). Durante el segundo paso de incubación, estos anticuerpos conjugados con HRP se unirán a cualquier complejo 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. Recubierto previamente con antígeno TPO 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 de 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 microplacas.
- 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 antes.
- 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	0.011
Calibrador B	25	0.241
Calibrador C	50	0.528
Calibrador D	100	1.129
Calibrador E	250	1.974
Calibrador F	500	2.868
Control 1	26.57	0.259
Control 2	277.96	2.074
Muestra	52.41	0.557

#### Limitaciones e Interferencia:

- El ensayo no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 1129 µmol/L o < 66 mg/dL), hemólisis (Hb < 0,93 mmol/L o < 1,5 g/dL), lipemialipemia (triglicéridos < 23,9 mmol/L o < 2100 mg/dL) y biotina (< 40,9 nmol/L o < 10 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 1500 UI/mL.
- Se realizaron pruebas in vitro en 23 productos farmacéuticos de uso común. No se encontraron interferencias con el ensayo.
- 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:

5,0-500 UI/mL (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite inferior de detección se notifican como < 5,0 UI/mL. Los valores por encima del rango de medición se notifican como > 500 UI/mL.

#### Límites Inferiores de Medición:

Límite inferior de detección: < 5,0 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 repetibilidad, n = 21).

#### Valores Esperados:

Los estudios realizados con el ensayo Anti-TPO que cubrieron un total de 217 sujetos sanos confirmaron el valor umbral utilizado actualmente de 34 UI/mL; este valor corresponde 94 por ciento. Por tanto, valores superiores a 34 IU/mL se consideran positivos para la presencia de autoanticuerpos anti-TPO.

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	15.28	0.81	5.17	1.24	7.85
Suero 2	134.27	5.76	4.29	8.40	6.24
Suero 3	209.91	7.82	3.78	11.27	5.45
PC Universal 1	33.84	1.82	5.53	2.15	6.38
PC Universal 2	258.43	10.00	3.87	11.81	4.57

\*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución.

#### Comparación de Métodos:

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

Número de muestras medidas: 112

Regresión Lineal.

$y = 1,0254x + 0,0193$

$r = 0,9731$

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 5,0 y 420 UI/mL.

#### Especificidad Analítica:

No se detectó ninguna influencia con autoanticuerpos humanos contra la tiroglobulina (< 390 UI/mL).

#### Referencias:

1. Pfannenstiel P, Saller B. Schilddrüsenkrankheiten – Diagnose und Therapie, 2ª edición. Berliner Medizinische Verlagsanstalt. 1995;28-30,141,169-172,200-201.
2. McIntosh RS, Asghar MS, Weetman AP. La respuesta de anticuerpos en la enfermedad tiroidea autoinmune humana. Clin Sci 1997;(92)6:529-541.
3. Volpé R. Uso Racional de Pruebas de Función Tiroidea. Crit Rev Clin Lab Sci 1997;34(5):405-438.
4. Feldt-Rasmussen U. Objetivos de rendimiento analítico y clínico para probar autoanticuerpos contra la tiroperoxidasa, la tiroglobulina y el receptor de tirotrópina. clin química 1996;42(1):160-163.
5. Utiger RD. La patogenia de la enfermedad tiroidea autoinmune. N Eng J Med 1991;325:278-279.
6. Gutekunst R. Hashimoto-Thyreoiditis: Diagnostik und Verlaufskontrolle. En: Börner W, Weinheimer B (Hrsg.): Schilddrüse 1989. Walter de Gruyter, Berlín, Nueva York 1991;348-355

