



COD 44754 96 Determinaciones
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para la determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular (tTG) Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

ANTICUERPOS ANTI-tTRANSGLUTAMINASA IgA

Enzimoinmunoensayo
PRUEBA EN MICROPLACA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos contra la transglutaminasa tisular (tTG) presentes en el suero se unen al antígeno adsorbido a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con anticuerpos anti-IgA humanas conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido y la formación de producto amarillo 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.** 100 mL. Tampón Tris 0,1 mol/L, cloruro de sodio 110 mmol/L, urea 2 mol/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-tTG tipo IgA, azida de sodio 15 mmol/L.
- C-. Control Negativo.** 2 mL. Suero negativo para anticuerpos anti-tTG, azida de sodio 15 mmol/L.
- D. Conjugado.** 12 mL. Anti-inmunoglobulina A humana conjugada con peroxidasa. Coloreado verde.
- E. Sustrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solución de Paro.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
PELIGRO: H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.
- M. Microplaca:** 96 pocillos separables individualmente recubiertos con tTG humana recombinante activada por gliadina y calcio.
- S1-S6. Patrones.** 1 mL. Listos para su uso. Suero anti-tTG, azida de sodio 15 mmol/L. Las concentraciones de anticuerpos anti-tTG IgA son 0, 5, 10, 25, 50 y 100 U/mL, según se indica en la etiqueta. Calibrados frente a un Patrón de Referencia Interno.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

Los sueros humanos utilizados en la preparación de los patrones, del control negativo y el control positivo eran 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 del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.

- Microplaca: 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 1/100 en Diluyente de Muestra (B) antes del ensayo.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir la bolsa de la microplaca (M) y retirar la cantidad necesaria de pocillos (Nota 2).
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.
 - **cuantitativa:** 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 3 veces (Notas 3 y 4).
6. Pipetear 100 µL de Conjugado (D) en cada uno de los pocillos.
7. Incubar los pocillos durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 5.
9. Pipetear 100 µL de Sustrato (E) en cada uno de los pocillos.
10. Incubar los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
11. Pipetear 100 µL de Solución de Paro (F) en cada uno de los pocillos (Nota 5).
12. Medir la absorbancia del contenido de cada pocillo a 450 nm usando el Patrón 0 U-IgA/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-tTG (U/mL). La concentración de anticuerpos en la muestra se calcula por interpolación en la curva de calibración (curvas recomendadas: 4-parametric logistic, cubic spline, one site-hyperbola).

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

$$A_{450nm} \text{ Valor Discriminante} = A_{450nm} \text{ Control Positivo} \times 0,29$$

Calcular la razón de absorbancias aplicando la siguiente fórmula:

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

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 12 U/mL o con razón de absorbancia superior a 1,2.

Se consideran negativas las muestras con concentraciones inferiores a 8 U/mL o con razón de absorbancia inferior a 0,8.

Las muestras con concentraciones comprendidas entre 8 y 12 U/mL o con razones comprendidas entre 0,8 y 1,2 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

La concentración del Control Positivo (C+) debe ser mayor de 12 U/mL, y la del Control Negativo (C-) debe ser inferior a 8 U/mL.

La razón de absorbancia para el Control Negativo (C-) debe ser inferior a 0,8.

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):

U/mL	CV %	n
10,1	7,8	25
36,1	6,9	25

– Reproducibilidad (interserie):

U/mL	CV %	n
10,1	10,3	25
36,1	10,0	25

– Límite de detección: 1,7 U/mL.

– 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: La hemólisis (hemoglobina < 1000 mg/dL), la lipemia (triglicéridos < 3000 mg/dL), la bilirrubina (< 40 mg/dL) y el factor reumatoide (300 IU/mL) no interfiere. Otras sustancias y medicamentos pueden interferir².

– Intervalo de medida: 1,7–100 U/mL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra con Diluyente de Muestra (B) y repetir la medición.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La transglutaminasa tisular (tTG) es el autoantígeno principal de los enfermos celíacos³. Los anticuerpos anti-tTG de la clase IgA se encuentran en pacientes con enfermedad celíaca o dermatitis herpetiforme⁴.

La especificidad de los ensayos ELISA anti-tTG para la enfermedad celíaca es del 94-100% y la sensibilidad es del 92-100%⁵. Para la dermatitis herpetiforme, la especificidad es del 98% y la sensibilidad del 89%⁴.

Dada la alta incidencia de deficiencia de IgA en pacientes celíacos⁶, en el caso de un resultado negativo para anti-tTG tipo IgA es recomendable la determinación de anti-tTG tipo IgG.

La sensibilidad y la especificidad para enfermedad celíaca del kit de Anticuerpos anti-tTG IgA de BioSystems fue del 95,0% y 99,4%, respectivamente, en un estudio con 227 muestras clínicas. Los resultados del estudio están disponibles bajo solicitud.

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. No mezclar componentes de distintos lotes de kit.
2. Guardar los pocillos que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior un máximo de 12 meses.
3. Tener cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos durante todo el procedimiento.
4. Es importante que no queden restos de Tampón de Lavado en los pocillos.
5. La Solución de Paro (F) detiene la reacción enzimática, por lo que se debe pipetear 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, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Medicine 1997; 3(7):797-801
4. Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Karpati S, Zagoni T, Riecken EO, Schuppan D. Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis. J Invest Dermatol 1999; 113:133-136.
5. Collin P. New diagnostic findings in coeliac disease. Ann Med 1999; 31:399-405.
6. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut 1998; 42:362-365.