

## **MANUAL DE INSTRUCCIONES:**

1) **NOMBRE DEL PRODUCTO:** IFIFLUOR MULTITEST TIROIDES (ATA)

**2) USO A QUE ESTA DESTINADO:**

Equipo de inmunofluorescencia para la determinación de anticuerpos anti-Tiroides (ATA). Uso in vitro.

**3) NÚMERO DE UNIDADES DE ANÁLISIS:**

El equipo permite 20 - 40 - 60 determinaciones de sueros individuales.

**4) FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Varias enfermedades de la glándula tiroides han sido descritas como de patología autoinmune: 1) tiroiditis bociosa difusa linfocítica tipo linfomatosa-Hashimoto y 2) tiroiditis juvenil linfocítica multifocal (asociada a tirotoxicosis, bocio adenomatoso o carcinoma).

La presencia de anticuerpos circulantes es el hecho más llamativo en la tiroiditis. Es importante conocer que el 30% de los pacientes con tiroiditis tiene además anticuerpos contra las células parietales gástricas y que el 50% de los pacientes con anemia perniciosa tienen también anticuerpos contra el citoplasma de las células tiroideas. Los anticuerpos antitiroides (ATA) están entre los primeros autoanticuerpos descritos en los humanos. Los anticuerpos antitiroides son inmunoglobulinas de clase IgG y los principales son: i) Anticuerpos dirigidos contra la tiroglobulina localizada dentro del folículo tiroideo, ii) Anticuerpos dirigidos contra los antígenos microsomaes (antimicrosomal) localizados dentro de las células epiteliales tiroideas de la pared de los folículos. El antígeno inmunodominante de esta fracción es la peroxidasa de tiroides (tiroperoxidasa). Se han descrito anticuerpos contra un segundo antígeno coloidal presente en el 10% de la población normal y en pacientes con tiroiditis distintas de Hashimoto.

La tiroiditis de Hashimoto es más común en mujeres de mediana edad o mayores, pero también ocurren en otros grupos etarios, incluyendo niños, en los cuales puede causar bocio. Ocurre con mayor frecuencia en individuos con historia familiar de enfermedades autoinmunes de tiroides. Los autoanticuerpos antitiroglobulina y antifracción microsomal están presentes en el suero del 90% de pacientes con tiroiditis de Hashimoto. Los anticuerpos antimicrosomaes son más frecuentes en esta enfermedad y usualmente presentan un título más alto que los antitiroglobulina. La enfermedad de Graves se presenta como una tirotoxicosis con bocio difuso. El diagnóstico inmunológico de esta enfermedad se basa en la detección de los autoanticuerpos tiroideos.

Con las técnicas de inmunofluorescencia como el equipo IFIFLUOR MULTITEST TIROIDES se pueden diagnosticar anticuerpos contra la tiroglobulina presente en los folículos tiroideos o contra el antígeno microsomal que se observa en el citoplasma de las células que recubren los folículos tiroideos. Mientras que la observación del antígeno microsomal es relativamente simple y reproducible, el diagnóstico de anticuerpos antitiroglobulina es más delicado, presentando un aspecto floculado. El segundo antígeno coloidal presenta al microscopio, un aspecto más uniforme distinto del floculado.

El equipo IFIFLUOR MULTITEST TIROIDES emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de auto-anticuerpos séricos dirigidos contra la glándula tiroides. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen cortes de tejido de la tiroides. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico. Luego de lavar para eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC. Un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

**5) RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO**

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LAS MUESTRAS: El suero debe ser diluido 1/20. Por ejemplo 0,1ml de suero en 1,9 ml de buffer BFS. De ser necesario titular, hacer las diluciones con buffer BFS. **NO DILUIR LOS CONTROLES DEL EQUIPO, SON LISTOS PARA USAR**

3. PREPARACION DE LAS IMPRONTAS:

A) Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

B) Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Tener la precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.

4. INCUBACION: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en una cámara húmeda tapada para evitar la evaporación de las muestras.

5. LAVADO: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS y reemplazarlo por BFS fresco, dejar en reposo 5 minutos más. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.

6. INCUBACION CON ANTIGAMMA GLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA. (diluirla previamente con BFS según rótulo). Sacar los portaobjetos del baño con BFS. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubrirlas con la ANTIGAMMA. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos. La cámara húmeda debe estar tapada para evitar la evaporación de la antigamma.

7. LAVADO: Repetir paso 5.

8. MONTAJE: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar cuidadosamente entre las áreas reactivas con papel de filtro cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos escrupulosamente limpios y con una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de burbujas que dificultan la lectura.

9. LECTURA: Leer en lo posible dentro de las primeras horas. Se pueden conservar en heladera 2-8°C por algunos días sellando los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas.

#### **6) INSTRUCCIONES PARA SU CONSERVACION:**

Inmediatamente de recibir el equipo guardar las improntas en freezer a -20°C y el resto del equipo en heladera de 2-8°C.

#### **7) FORMA DE PRESENTACION:**

Equipos de 20, 40 y 60 determinaciones.

#### **8) COMPOSICION, DESCRIPCION CUALI-CUANTITATIVA DE LOS COMPONENTES. INDICACIONES ACERCA DE LA PREPARACION DE LOS COMPONENTES EN CASO DE NO SER LISTOS PARA USO**

##### MATERIALES PROVISTOS

Según sean 20, 40 o 60 determinaciones:

	20 det.	40 det.	60 det
Portaobjetos de 6 áreas reactivas (4 det + 2 controles)	5	10	15
Antigamma globulina humana marcada con FITC	0.10 ml	0.15 ml	0.20 ml
Sobre de buffer fosfato salino pH 7,2 ± 0.2 para reconstituir a 1 litro	1	2	3
Suero humano control positivo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Suero humano control negativo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Medio de montaje	3 ml	5 ml	5 ml
Cubreobjetos (opcional)	5	10	15
Instrucciones de uso	1	1	1

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LA ANTI-GAMMA GLOBULINA HUMANA: Diluir el volumen a utilizar en BFS de acuerdo a la dilución recomendada en el rótulo del frasco.

##### MATERIALES REQUERIDOS , NO PROVISTOS

- Agua destilada para preparar el BFS
- Tubos de ensayo para las diluciones de muestras y la antigamma
- Gradillas adecuadas
- Pipetas de 5 ml, pipetas automáticas
- Cámara húmeda o placas de Petri con papel embebido en agua destilada
- Frascos tipo Coplin
- Cronómetro
- Microscopio de fluorescencia equipado para observar fluoresceína

#### **9) MUESTRAS A EMPLEAR . CONDICIONES DE OBTENCION DE LA MISMA.**

Se debe emplear suero, no usar muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas. Si no se procesarán inmediatamente los sueros, se pueden conservar congelados a -20°C por un tiempo prolongado. PRECAUCION: Evitar los ciclos de congelamiento-descongelamiento de las muestras.

**10) CALCULO DE RESULTADOS, UNIDADES DE EXPRESION, ORIGEN DE LOS PATRONES UTILIZADOS O DE SU EQUIVALENCIA EN ESTANDARES INTERNACIONALES**

Los sueros positivos para autoanticuerpos anti-microsomales de tiroides presentan una fluorescencia citoplasmática bien nítida en las células que recubren los folículos tiroideos. Se distingue una tinción en el citoplasma muy nítida alrededor del núcleo. Debe observarse cuidadosamente pues las células tiroideas son generalmente de tamaño pequeño con un núcleo grande. Los anticuerpos anti-tiroglobulina presentan una fluorescencia dentro de los folículos tiroideos, que puede tener un aspecto flocular o linear.

IMPORTANTE: Es fundamental en cada impronta verificar el resultado correcto de los controles positivo y negativo que deben utilizarse en cada ensayo. Un resultado incongruente de estos controles invalida el ensayo.

**11) INTERVALO DE NORMALIDAD O INTERVALO TERAPEUTICO:**

El título empleado para los sueros hace que solamente se visualice fluorescencia en los sueros positivos.

**12) DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA: SENSIBILIDAD, PRECISION, EXACTITUD, ESPECIFICIDAD, POTENCIA, ESTABILIDAD.**

**Sensibilidad:** Desde los primeros trabajos de Coons se reconoce que la técnica de inmunofluorescencia tiene una alta sensibilidad para detectar anticuerpos. Sin embargo la sensibilidad puede ser afectada por una variedad de factores externos (tipo de microscopio, intensidad de la lámpara y su tiempo de uso, sistema de filtros, la aptitud del observador, etc). En particular la técnica de inmunofluorescencia presenta una mayor sensibilidad para detectar los anticuerpos anti microsomales tiroideos. Algunos autores recomiendan la fijación de las improntas con etanol a 56°C para aumentar la sensibilidad de la detección de autoanticuerpos anti-tiroglobulina.

**Precisión:** Se han realizado repeticiones del ensayo para una serie de 10 sueros positivos, de diferentes títulos, incluyendo positivos débiles y fuertes. En ningún caso los resultados difirieron en más de un título, tanto intraensayo como interensayo.

**Especificidad:** Se han testeado sueros positivos para diferentes patologías autoinmunes y parasitarias, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**Estabilidad:** Conservando el equipo en las condiciones especificadas, el material no sufre deterioro dentro del plazo de actividad fijado. La anti-gamma diluída no debe reutilizarse y debe ser preparada fresca en cada ensayo. El buffer BFS es estable durante 4 semanas a 2-8°C. Se recomienda filtrar el BFS una vez reconstituido.

**13) PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO. LIMITACIONES DEL METODO, SUSTANCIAS INTERFERENTES, ETC.****PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

-Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles de este equipo han sido encontrados no reactivos para la presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos antiviral de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1+2) y Hepatitis C. Dado que ningún test diagnóstico puede ofrecer una seguridad absoluta acerca de la ausencia de los virus HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos basados en productos humanos deben ser tratados como potencialmente infectivos.

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.

-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores). Después de los pasos de lavado, se recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del portaobjetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas.

-Algunos de los componentes de este equipo contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas. Cuando se descarten los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de estos compuestos.

-Nunca pipetear con la boca o permitir que muestras de pacientes entren en contacto con la piel.

-Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos, muestras y materiales para limpieza deben ser descartados de manera de inactivar los agentes infecciosos. Se recomienda utilizar en la descontaminación hipoclorito de sodio al 1%, durante un tiempo igual o mayor a 30 minutos.

-Sólo para uso diagnóstico in vitro.

**LIMITACIONES**

-El usuario del equipo debe leer cuidadosamente el inserto. El cumplimiento estricto del protocolo es indispensable para obtener resultados confiables. Ante cualquier duda comunicarse con nuestro Servicio de Asesoría Técnica.

-El exceso de lípidos en el suero a testear produce una reacción "filming" (película que encubre la reacción específica). No confundir con reacción positiva.

-La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**14) BIBLIOGRAFIA:**

1-COONS AH, GREECH HJ, JONES RM, THE DEMONSTRATION OF NEUMOCOCCAL ANTIGEN IN LISSIES BY THE USE OF FLUORESCENT ANTIBODY. J. IMMUNOL 1942, 45:159-170

2-NAKAMURA RM, DEODHAR S. LABORATORY TESTS IN THE DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE DISORDERS. AM. SOC. CLIN. PATHOL, 1976, CHICAGO.

3-DONIACH DJ, THYROID AUTOIMMUNE DISEASE. J. CLIN. PATHOL. 1967, 20: 385-390.

4-TUNG KS. ANTITHYROID ANTIBODIES IN JUVENILE LYMPHOCITIC THYROIDITIS. AM. J. CLIN. PATHOL. 1974, 61: 549-555.

**15) ESTABLECIMIENTO IMPORTADOR Y/O ELABORADOR. NOMBRE DEL DIRECTOR TECNICO, DOMICILIO LEGAL Y EN CASO DE PRODUCTOS IMPORTADOS TOTALMENTE TERMINADOS O FRACCIONADOS DEBERA CONSTAR EL ORIGEN DE ELABORACION (NOMBRE DE LA FIRMA Y DIRECCION)**

Establecimiento elaborador: LABORATORIO IFI

Directora Técnica: Bioq. Liliana Roquel

Domicilio Legal: Chile 523 (1603) Villa Martelli - Buenos Aires

**16) LEYENDA "PRODUCTO DE DIAGNOSTICO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, NUMERO"**

Producto de diagnóstico autorizado por el Ministerio de Salud y Acción Social Nro.