

Para uso Profesional de Diagnóstico In Vitro.

USO PREVISTO

El kit TSH Neonatal se utiliza para la cuantificación por ensayo inmunoenzimático de TSH Neonatal en sangre entera humana.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

La determinación del hipotiroidismo dentro de los primeros días de nacimiento ha sido reconocida como la prueba diagnóstica más importante en recién nacidos por la American Thyroid Association. La necesidad de su detección temprana y tratamiento ha resultado en el establecimiento de centros de tamizaje por los departamentos de salud federales y estatales. Un programa de detección temprana de neonatos para el hipotiroidismo congénito se inició en Quebec, Canadá a principios de los años setenta. Utilizaron manchas de sangre seca en papel de filtro como dispositivo de muestreo. Muy pronto el programa fue seguido por otras instituciones importantes de salud pública en Canadá y los EE.UU. En 1978 casi un millón de niños habían sido examinados y una tasa de incidencia de hipotiroidismo congénito se estableció en aproximadamente 1 de cada 7000 nacimientos. El hipotiroidismo congénito es probablemente la causa prevenible más común de retraso mental. El diagnóstico y tratamiento del hipotiroidismo congénito dentro de los primeros 1-2 meses después del parto parece ser necesario para prevenir el retraso mental grave.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La hormona estimulante de la tiroides neonatal de Calbiotech (TSH) es una ELISA tipo sandwich en manchas de sangre seca (spots) en papel filtro tipo 903 de WHATMAN. En el ensayo, los pocillos revestidos con estreptavidina se incuban con los spots y anticuerpo monoclonal conjugado con biotina anti TSH para formar un complejo de estreptavidina-mAb-TSH de biotina. Después de las etapas de lavado, se añade otro anticuerpo anti-TSH marcado con HRP para reconocer el complejo anterior y completar el sandwich. El mAb marcado con HRP sin unir se elimina luego por las etapas de lavado. Se añade sustrato TMB, resultando en el desarrollo de color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de solución de paro, y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Se prepara una curva estándar que relaciona la intensidad del color con la concentración de TSH.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

Materiales provistos	96 pruebas
1. Micropozos recubiertos con estreptavidina	12X8X1
2. Estándares de TSH neonatal: 6 spots de sangre seca	6
3. Control TSH Neonatal: 3 niveles en spots de sangre seca	6
4. Reactivo biotina: 1 botella	12 mL
5. Enzima conjugada HRP-mAb: 1 botella	12 mL
6. Sustrato TMB: 1 botella	12 mL
7. Solución de paro: 1 botella	12 mL
8. Solución de lavado concentrada 20X: 1 botella	25 mL

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Perforadora de 1/8 "
2. Agitador orbital
3. Agua destilada
4. Micropipetas de precisión
5. Lector de microplaca de ELISA

ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit entre 2-8°C.
2. Mantenga los micropozos en el sobre con desecantes.
3. No exponga los reactivos al calor, sol o luz intensa.

PRECAUCIONES

1. Los calibradores y controles contienen componentes humanos los cuales fueron probados con reactivos aprobados por la FDA y no reaccionaron contra el antígeno de superficie del hepatitis B así como tampoco contra anticuerpos anti-VIH. Sin embargo no hay métodos que puedan ofrecer la completa seguridad de que el virus del VIH, hepatitis B u otras infecciones no estén presentes. Estos reactivos deberán ser manejados como nivel de bioseguridad 2, como lo recomienda la CDC/NIHM.
2. Este kit es para uso diagnóstico in vitro solamente.
3. Los componentes de este kit están diseñados para trabajar de manera integral, no deberán mezclarse con los componentes de diferentes lotes.

RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

Siga las directrices de la publicación NCCLS LA4T7 para recolectar muestras de sangre en el programa de Tamiz neonatal. Utilice papel filtro tipo 903 de WHATMAN. Para las muestras de detección de CAH, recoger muestras de 3 a 5 días después del nacimiento. Utilice lancetas desechables con puntas de menos de 2,5 mm para pinchar los lados mediano o lateral de la parte inferior del talón. Permita que se forme una gota de sangre con un volumen suficiente para llenar un punto de 5/8 pulgadas de diámetro en el papel de filtro. Suavemente toque la gota de sangre con el papel de filtro. NO PRESIONE CONTRA LA PIEL. NO TOQUE EN LA ZONA MANCHADA. Mantener los papeles manchados horizontalmente y permitir el secado a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 horas. Evite manchas que toquen otras superficies y mantenga alejado de la luz directa. Las muestras deben ser transportadas al laboratorio dentro de las 24 horas posteriores a la recogida en un recipiente de almacenamiento apropiado. El laboratorio debe almacenar los especímenes a 2-8°C protegidos de la humedad y la luz directa. Las manchas de sangre secas son estables durante al menos 3 semanas a 2-8 ° C protegido de la luz y la humedad. Rechazar muestras con las siguientes condiciones:

1. Muestras no colectadas en papel filtro 903 WHATMAN
2. Spots de sangre incompletamente saturados.
3. Spots de sangre con apariencia de agrietamiento o coagulación.
4. Spots de sangre con apariencia de humedad.

PREPARACION DEL REACTIVO

Buffer de lavado: prepare la solución de lavado 1x adicionando el contenido de la botella (25 mL, 20X) a 475 mL de agua destilada. Almacene a temperatura ambiente (20-25°C).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

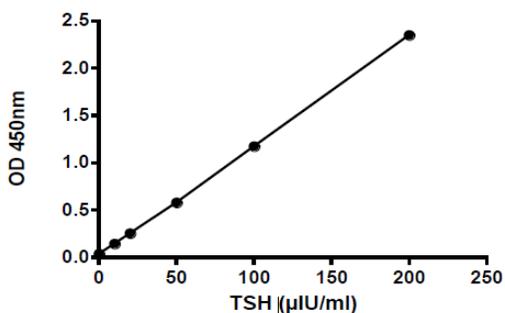
1. Coloque el número de pozos deseado en la placa.
2. Perfore los spots de sangre de 1/8" de pulgada de cada estándar, muestra y control (NOTA: no perfore los spots en áreas que estén impresas o las que estén cerca de los bordes del spot).
3. Coloque los spots perforados en su pocillo respectivo.
4. Agregue 100 μL de biotina a todos los pocillos.
5. Mezcle la placa gentilmente por 30 segundos. Asegúrese que todos los spots están completamente sumergidos en el líquido y que no están adheridos a las paredes de los pocillos.
6. Cubra la placa e incube por 60 minutos en un agitador a 900 rpm.
7. Remueva el contenido de los pocillos por decantación o aspiración. Asegúrese que todos los spots fueron removidos de los pocillos. Enjuague los pocillos con la solución de lavado 1X 5 veces. Golpee la placa contra papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual.
8. Agregue 100 μL de enzima conjugada a cada pozo.
9. Cubra la microplaca e incube por 60 minutos en agitación a 900 rpm.
10. Enjuague los pocillos 5 veces con buffer 1X.
11. Agregue 100 μL de solución TMB a cada pocillo.
12. Cubra la microplaca e incube durante 15 minutos en agitación a 900 rpm.
13. Agregue 50 μL de solución de paro a cada pocillo y mezcle gentilmente hasta tener un color uniforme en cada pocillo.
14. Lea la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas de ELISA con una longitud de onda de 450 nm. El color es estable durante 15 minutos.

CALCULO DE RESULTADOS

Una curva estándar es construida de la siguiente manera:

1. Calcule el promedio de absorbancia de cada set de estándar y muestras de pacientes.
2. Para construir la curva estándar, grafique la media de las absorbancias de cada estándar de TSH (eje vertical) contra su concentración en $\mu\text{IU/mL}$ (eje horizontal).
3. Dibuje una curva uniendo los puntos graficados.
4. Lea las absorbancias de cada paciente e interpole con la curva construida.

Estándar	OD450nm	Conc. ($\mu\text{IU/mL}$)
1	0.041	0
2	0.146	10
3	0.257	20
4	0.582	50
5	1.176	100
6	2.351	200



VALORES ESPERADOS

La Academia Americana de Pediatría (AAP) ha publicado las directrices recomendadas para la detección del hipotiroidismo congénito en los recién nacidos. En lactantes de 2 a 6 días de edad, estas recomendaciones clasifican las concentraciones de TSH como valores relativos "normales", "elevados" o "sólo ligeramente elevados" de 20 y 40 $\mu\text{IU} / \text{ml}$. Según las pautas de la AAP, "cualquier niño con una concentración baja de T4 y TSH mayor de 40 $\mu\text{IU} / \text{ml}$ se considera tiene hipotiroidismo primario hasta que demuestre lo contrario". Además, "en los casos en que la concentración de TSH esté solamente ligeramente elevada, por encima de 20 $\mu\text{IU} / \text{ml}$ pero menos de 40 $\mu\text{IU} / \text{ml}$, se deberá obtener otro espécimen de papel de filtro para una prueba posterior".

REFERENCIAS

1. Hopton MR and Harrap JJ, "Immunoradiometric assay of thyrotropin as a first line thyroid function test in the routine laboratory", *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986).
2. Caldwell G, et al, "A new strategy for thyroid function testing", *Lancet*, I, 1117 (1985)
3. Young DS, Pestaner LC and Gilberman U, "Effects of drugs on Clinical Laboratory Tests", *Clinical Chemistry*, 21, 3660 (1975).
4. Spencer CA, et al, "Interlaboratory/Intermethod differences in Functional Sensitivity of Immunometric Assays of Thyrotropin (TSH) and Impact on Reliability of Measurement of Subnormal Concentrations of TSH", *Clinical Chemistry*, 41, 367 (1995).
5. American Academy of Pediatrics, "Newborn Screening for congenital hypothyroidism: recommended guidelines", *Pediatrics*; 92, 1203-09 (1993).
6. Centers for Disease Control, Proceedings of a conference on a national model for Standardization of Neonatal Hypothyroid Screening Programs [Atlanta 1979].