

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

DESCRIPCIÓN

La prueba TSH CLIA es un inmunoensayo sólido de dos posiciones. Un anticuerpo monoclonal cubre las superficies de los pocillos micro titulados y otro anticuerpo monoclonal es etiquetado con peroxidasa caballo-rábado el cual es usado como rastreador. Las moléculas de TSH presentes en el estándar o en el suero son emparejadas entre los dos anticuerpos. Siguiendo la formación del complejo anticuerpo recubierto-antígeno-anticuerpo-enzima. Las etiquetas des adheridas anticuerpo-enzima son removidas mediante el lavado. La peroxidasa caballo-rábado adherida en los pocillos es analizada por reacciones quimioluminiscentes. La unidad de luz relacionada (RLU) es proporcional a la concentración de TSH presente en la muestra.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La determinación de niveles de suero y plasma de TSH es reconocida como un método sensible en el diagnóstico de hipotiroidismo primario y secundario. La TSH es segregada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria e induce la producción y liberación de tiroxina y Triiodotironina de la tiroides. Es una glicoproteína con un peso molecular de 28,000 Daltons, la cual consiste en dos subunidades químicamente diferentes, alfa y beta. Aunque la concentración de TSH en la sangre es extremadamente baja, es esencial para el mantenimiento normal de la función de la Tiroides. La liberación de TSH es regulada por una hormona liberadora de TSH (TRH) producida por el hipotálamo. Los niveles de TSH y TRH están inversamente relacionados al nivel de hormona tiroidea. Cuando existe un nivel alto de hormona tiroidea en la sangre, el hipotálamo secreta menos TRH, por lo que menos TSH es secretada por la pituitaria. La acción opuesta ocurrirá cuando exista una disminución en la hormona tiroidea en la sangre. Este proceso es conocido como un mecanismo de retroalimentación negativa y es responsable de mantener los niveles adecuados de estas hormonas en la sangre. La TSH y las glicoproteínas de la pituitaria tales como la hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona gonadotropina coriónica (HCG) tienen cadenas alfa idénticas. La cadena beta es distinta, pero contiene regiones con secuencias idénticas de aminoácidos, lo que puede causar una reacción cruzada con algunos anticuerpos policlonales anti-TSH. El uso de un anticuerpo monoclonal en este ensayo de TSH elimina esta interferencia, que puede resultar en valores falsamente elevados de TSH en mujeres menopáusicas o embarazadas, una población cuya evaluación del estatus tiroideo es clínicamente significativa.

CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pruebas:

1. Placa con 96 pozos.
2. Enzima Conjugada: 1 vial con 6 ml.
3. 6 calibradores: con 1.5 ml con concentraciones 0.25, 0.5, 2, 10, 30 Y 60 µU/ml.
4. Sustrato A: 6 ml.
5. Sustrato B: 6 ml.
6. Control 1 y 2 liofilizado.
7. PBS-T en polvo (buffer de lavado, 2 bolsas 5g).
8. 1 bolsa zip-lock.
9. 2 piezas de papel adherente.
10. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión 20-200 µl, 100-1000 µl (se recomienda el uso de puntas desechables).
2. Agua destilada.
3. Papel absorbente o una toalla de papel.
4. Vórtex mezclador o equivalente.
5. Papel milimétrico para graficar.
6. Luminómetro.
7. Incubadora.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Los kits de prueba sin abrir deben guardarse a una temperatura de entre 2°C-8°C a partir de su recepción y la placa de microporos debe guardarse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El kit de prueba se puede utilizar hasta la fecha de caducidad. Consulte la etiqueta del frasco para la fecha de caducidad.
2. Los kits de prueba abiertos se mantendrán estables por 2 meses o hasta la fecha de caducidad lo que ocurra primero.
3. Los calibradores reconstituidos y almacenados entre 2-8°C permanecerán estables por 1 mes, para un uso prolongado almacene en alícuotas y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. La insuficiencia de lavado se traducirá en mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
2. Se recomienda que no más de 32 pozos sean utilizados para cada ensayo, si el pipeteado es manual, ya que los estándares y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pocillos puede utilizarse si el pipeteado es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y especímenes, aunque no es obligatorio, se recomienda.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse usando técnicas estándar de venopunción y el suero debe ser separado tan pronto como sea posible. Evite la hemólisis, lipemia o turbidez excesiva en las muestras.
2. Muestras de plasma recogidas en tubos que contengan EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con los resultados y deben evitarse.
3. Las muestras se pueden almacenar hasta 48 horas entre 2-8 °C. Los especímenes almacenados por un tiempo prolongado pueden ser congelados a -20°C. Los especímenes descongelados deben ser mezclados antes de la prueba.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben ser sometidos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse suavemente por inversión o agitación antes de su uso. Evitar la formación de espuma.
2. Para la preparación de la solución de lavado PBS-T, agregar un sobre en 500 ml de agua destilada. Mezcle bien hasta asegurarse de que los sólidos se encuentren diluidos por completo. Esta solución se mantendrá estable a temperatura ambiente por lo menos durante 2 meses.
3. Determine la cantidad de solución de sustrato necesaria y prepárela mezclando partes iguales del sustrato A y B en un contenedor limpio.
4. Descartar esta solución sino se utiliza 20 minutos después de mezclar.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de microporos en la placa.
2. Dispensar 100 µl de estándares, muestras y controles a cada pocillo.
3. Dispensar 50 µl de enzima conjugada en cada pocillo.
4. Mezclar suavemente durante 30 segundos. Es muy importante el mezclado completo en este paso.
5. Incubar a 37°C por 60 minutos.
6. Deseche el contenido de la placa en un contenedor de residuos por aspiración o decantación, si decanta, golpee la placa contra un papel absorbente.
7. Agregue 350 µl de solución PBS-T a cada pocillo y deseche el contenido. Golpear la placa sobre un papel absorbente para eliminar todas las gotas de agua residual. Repetir el procedimiento por 4 veces más hasta completar un total de 5 lavados.
8. Dispensar 100 µl de solución de sustrato A y B. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
9. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU de cada pocillo con un Luminómetro.

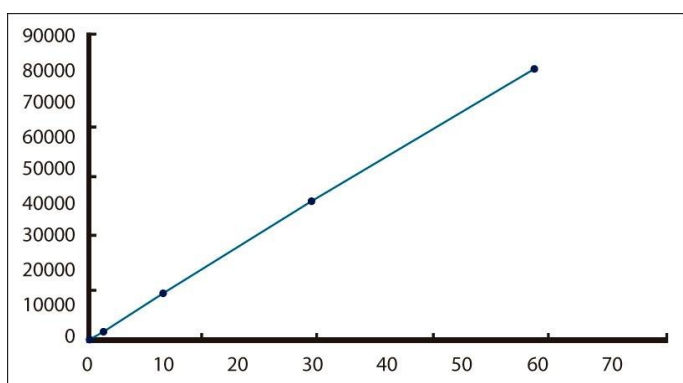
CÁLCULO DE RESULTADOS

Le recomendamos utilizar el software adecuado para el cálculo de los resultados, en caso de que esto no sea posible, construya una curva estándar trazando los RLU's obtenidos a partir de cada calibrador contra su concentración en $\mu\text{IU/ml}$ en papel milimétrico, con los valores RLU's en la vertical o eje Y, y las concentraciones en la horizontal o eje X. Utilice los RLU's de cada muestra para determinar la concentración correspondiente de la TSH $\mu\text{IU/ml}$ por interpolación de la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Una curva típica estándar se muestra a continuación, es para fines de ilustración solamente, y nunca se debe utilizar en lugar de la curva de calibración real.

Concentración ($\mu\text{IU/ml}$)	RLU's
0.25	179
0.5	357
2	1899
10	13227
30	40746
60	80418



VALORES DE REFERENCIA

Un valor normal de TSH en suero es de 0.35 a 5.29 $\mu\text{IU/ml}$, el cual fue obtenido probando 187 muestras de pacientes definidos como normales por un médico. Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en la población de pacientes.

PERFORMANCE

1. Precisión:

La precisión Intra-ensayo es de $<10\%$ y se determinó analizando 3 sueros humanos (alto, medio y bajo) con 20 repeticiones de cada uno.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Bajo	20	0.186	0.01	6.1
Medio	20	6.241	0.16	2.49
Alto	20	22.483	0.81	3.61

La precisión Inter-ensayo se determinó analizando duplicados de 3 sueros, una vez por día durante 20 días.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Bajo	40	0.164	0.19	11.35
Medio	40	6.204	0.32	5.18
Alto	40	22.08	1.23	5.57

2. Sensibilidad:

La sensibilidad, definida como la concentración correspondiente a la media de RLU's de 20 réplicas del diluyente del calibrador más 2 desviaciones estándar, es $<0.08 \mu\text{IU/ml}$.

3. Especificidad:

Este ensayo está diseñado para tener una especificidad analítica menor que 0.5 $\mu\text{IU/ml}$ de reactividad cruzada, con las substancias que se muestran a continuación y a las concentraciones que se indican.

Substancia	Concentración ($\mu\text{IU/ml}$)	Valor medido ($\mu\text{IU/ml}$)
HCG	500	0.07
FSH	500	0.09
LH	500	0.07

4. Medición de precisión por correlación:

Un estudio fue realizado en el que las muestras fueron probadas por este ensayo y un ensayo por ELISA que existe actualmente en el mercado. Los datos se analizaron y se muestran a continuación.

Método de correlación	Número	Intercepto	Pendiente	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	180	0.089	0.9514	0.958

EFEECTO GANCHO DE DOSIS ALTA

Una muestra adicionada con más de 4000 $\mu\text{IU/ml}$ de TSH da un RLU mayor que el último punto de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Las Buenas prácticas de laboratorio requieren que las muestras de control de calidad se procesen con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo y la validez de los resultados. Controles con azida sódica no se deben emplear.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una completa comprensión de las instrucciones y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio. Los anticuerpos heterófilos y el factor reumatoide en el suero pueden interferir con los resultados de la prueba. Los pacientes expuestos rutinariamente a productos de suero de origen animal, pueden ser propensos a esta interferencia y valores anómalos se pueden observar. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico.
- La concentración sérica de TSH depende de una multiplicidad de factores: la función hipotalámica y su regulación, la concentración de la TBG y la unión de la TBG a la TSH. Por lo tanto, solo la concentración de TSH no es suficiente para evaluar el estatus clínico. Los resultados obtenidos en este ensayo se deben utilizar siempre en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y otros hallazgos.

REFERENCIAS

- Walker WH. An approach to immunoassay. Clin. Chem. 1977; 23(2 Pt 2): 384-402.
- Kirkegaard C, Friis T, Siersbaek-Nielsen K. MEASUREMENTS OF SERUM TRIIODOTHYRONINE BY RADIOIMMUNOASSAY. Acta Endocrinologica. 1974; 77(1): 71-81.
- Lieblich J, Utiger RD. Triiodothyronine radioimmunoassay. J. clin. Invest. 1972; 51(1): 157-166.
- Spencer C, Takeuchi M, Kazerozyan M, 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. Clin. Chem. 1995; 41(3): 367-374.