

TSH

Prueba ELISA para la determinación cuantitativa de Tirotopina (TSH) en suero humano

Presentación del estuche

[REF]	54030	96 determinaciones	Estuche completo
[IVD]			

Uso previsto

La Tirotopina (TSH) es una hormona glicoproteínica de approx. 28 kD, secretada por la glándula pituitaria anterior. Es considerada el indicador disponible más sensible para el diagnóstico del hipotiroidismo primario y secundario (pituitaria) (1,2). Aumento en la concentración de TSH en suero es un indicador sensible y temprano de disminución en la reserva tiroidea y en conjunto con la disminución de T4 se diagnostica hipotiroidismo primario. El incremento esperado de la TSH demuestra la clásica retroalimentación negativa del sistema entre las glándulas tiroideas y pituitaria. Además, la determinación de TSH es útil en la diferenciación del hipotiroidismo secundario y terciario de la enfermedad tiroidea primaria. En el hipotiroidismo secundario y terciario, las concentraciones de T4 son usualmente bajas y los niveles de TSH son generalmente bajos o normales.

Principio - Sandwich EIA -

La prueba de TSH ELISA est basada en la técnica cl sica de sandwich. Como una prueba de segunda generación, usa un anticuerpo monoclonal anti-TSH altamente específico que est fijado en la superficie de los micropocillos. En el primer paso de incubación, las muestras, los calibradores o controles y el conjugado enzim tico (anti-TSH marcada con peroxidasa) se forma el complejo tipo sandwich el cual se une a la superficie de los micropocillos por ser fijado al anticuerpo inmovilizado. Al final de la incubación el exceso de conjugado enzim tico y anticuerpos monoclonales son eliminados por el lavado. Se agrega el reactivo sustrato (etapa 2) y el color resultante, el cual cambia a amarillo luego de agregar la solución de parada, es medido fotometricamente. El incremento de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TSH en la muestra. La concentración es evaluada por medio de la curva de calibración la cual es establecida con los calibradores suministrados con el estuche .

Reactivos y contenidos

[MIC]	12	Tiras de Micropocillos (en portatiras) Tiras divisibles de 8 pocillos, recubiertos con anti-TSH (monoclonal, ratón)
[CAL]	A - F	Calibradores tapas y etiquetas coloreadas (A: blanco, B: amarillo, C: verde, D: rojo, E: azul, F: negro) 6x2,0ml listos para usar (humanos) Concentraciones de TSH: 0 (A), 0,5 (B), 3,0 (C), 6,0 (D), 15,0 (E) y 30,0 (F) mU/l.
[CON]	13 ml	Conjugado enzimático (tapa blanca) listo para usar, <u>coloreado rojo</u> pH 6,25 ± 0,1 anti-TSH (cabra), marcado con Peroxidasa
[WS]	50 ml	Solución de Lavado (tapa blanca) Concentrado para 1000 ml pH 7,2 ± 0,2 Buffer TRIS 10 mmol/ NaCl 8 g/l
[SUB]	15 ml	Reactivo Sustrato (tapa negra) listo para el uso, sin color a azulado pH 3,6 ± 0,25 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 1,2 mmol/l Peróxido de Hidrógeno 3,0 mmol/l
[STOP]	15 ml	Solución de Parada (tapa roja) Acido sulfúrico 0,5 mol/l
	1	Tira adhesiva

Agentes preservantes: Concentración total < 0,1 %

Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **[CAL]** deberían ser manipulados como posibles agentes potencialmente infecciosos. **[CAL]** han sido encontrados negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **[CAL]** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

[STOP] irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C. Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

[MIC] (Código: TSH)

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de expiración (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de lavado de trabajo **[WASH]**

- Diluir 1 porción de **[WS]** con 20 porciones de agua desionizada fresca, por ejemplo : 50 ml **[WS]** + 1000 ml = 1050 ml.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C**.

Muestra

Suero
No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.
Las muestras pueden almacenarse por 5 días a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

- U1:** No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.
- U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.
- U3:** Notar el reparto **[CAL]**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.
- U4:** **[MIC]** - sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.
- U5:** **Analizar** cada **[CAL]**, control o muestra **por duplicado. Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.
- U6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **[CAL]** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración para cada placa.
- U7:** Evitar/eliminar burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.
- U8:** **[SUB]** inicia y **[STOP]** termina una reacción cinética. **Evitar la luz intensa** durante el desarrollo del color.
- U9:** **[MIC]** - **Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec.** sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si está disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 5 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, **remover el líquido remanente** invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibradores	E2... Muestras
[CAL] A-F; en duplicado	50	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	50
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con cinta adhesiva		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 5 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	100	100
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 30 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

Validación de la prueba

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios :

Absorbancia máxima ([CAL] F) D.O. $\geq 1,2$

Concentración TSH al 80% absorbancia máx. = $22 \pm 4,2$ mIU/l

Concentración TSH al 50% absorbancia máx. = $13 \pm 3,1$ mIU/l

Concentración TSH al 20% absorbancia máx. = $4,8 \pm 2,6$ mIU/l

Cálculo

Una curva de calibración se usa para interpolar la concentración de TSH en las muestras desconocidas.

- [CAL] - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de TSH en mIU/l sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
- Trazar la mejor curva a través de los puntos graficados.
- Para determinar la concentración de TSH en una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, hallar el punto de intersección sobre la curva, y leer la concentración (en mIU/l) en el eje horizontal del gráfico (ver ilustración).

Interpretación de resultados

La concentración de TSH en el suero depende de una diversidad de factores: función del hipotálamo, función del tiroides, y la respuesta de la pituitaria a la TRH. Así, la concentración de la tirotrina por sí sola no es suficiente para llegar a un diagnóstico clínico definido. La TSH puede estar elevada por acción farmacológica. Domperidona, amiodazona, yodo, fenobarbital, y fenitoina han sido reportadas como drogas que incrementan los niveles de TSH. Una disminución de la TSH ha sido reportada con la administración de propanolol, metimazol, dopamina y D-tiroxina. Variaciones genéticas o degradación de la TSH intacta en las subunidades pueden afectar las uniones características de los anticuerpos e influir en el resultado final. Tales muestras normalmente dan diferentes resultados con varias técnicas debido a la reactividad de los anticuerpos involucrados.

Valores esperados

Resultados de un estudio con una población eutiroides:

Rango Normal: 0,3 – 6,2 mIU/l TSH

Cada laboratorio debería determinar sus propios rangos de referencia utilizando los instrumentos/equipos, métodos de colección de sangre y técnicas de análisis usuales empleados normalmente en dicho laboratorio.

Datos de rendimiento

La prueba TSH ELISA como análisis de la segunda generación tiene una sensibilidad analítica de < 0,10 mIU/l TSH y puede por lo tanto distinguir la población hipertiroides de la población eutiroides.

Las muestras con concentraciones sobre 30 mIU/l pueden diluirse con [CAL] A (0,0 mIU/l TSH) y ser reanalizadas. Para obtener la concentración de estas muestras se multiplica el resultado por el factor de dilución.

El análisis se estandarizó según el estándar OMS 2º IRP (80/558) para TSH.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

www.human.de/data/gb/vr/el-tsh.pdf o

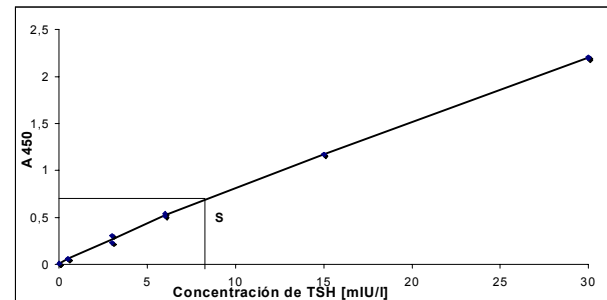
www.human-de.com/data/gb/vr/el-tsh.pdf

Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



Referencias

- Barker, S. B., Determination of Protein Bound Iodine, Journal Biological Chemistry **173**, 175 (1948)
- Chopra, I. J. et al., A Radioimmunoassay of Thyrotropin, J. Clinical Endocrinol. **33**, 865 (1971)
- Young, D. S. et al., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, Clinical Chemistry **21**, 3660 (1975)
- Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press, p. 19 - 51 (1975)

EL-TSH
INF 5403H01 E
07-2004-24



Human