

TSH

(Tirotropina)

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de tirotropina en suero humano.

Resumen:

La hormona estimulante de la tiroides (TSH, tirotropina) es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aprox. 30000 daltons y consta de dos subunidades. La medición de la concentración sérica a menudo de tirotropina (TSH), una glicoproteína con un peso molecular de 28.000 daltons y secretada por la pituitaria anterior, generalmente se considera como el indicador más sensible disponible para el diagnóstico de hipotiroidismo primario y secundario (hipófisis) (1,2). Las mediciones de TSH son igualmente útiles para diferenciar los niveles secundarios y terciarios. hipotiroidismo (hipotalámico) de la enfermedad tiroidea primaria. La liberación de TSH de la hipófisis está regulada por el factor liberador de tirotropina (TRH), que es secretada por el hipotálamo y por la acción directa de la T4 y la triyodotironina (T3), las hormonas tiroideas, en la hipófisis. Aumenta los niveles de T3 y T4 reduce la respuesta de la hipófisis a los efectos estimulantes de la TRH, secundaria e hipotiroidismo terciario, las concentraciones de T4 suelen ser bajas y los niveles de TSH son generalmente bajo o normal. Deficiencia de TSH hipofisaria (hipotiroidismo secundario) o insuficiencia de estimulación de la pituitaria por TRH (hipotiroidismo terciario) causa esto. La prueba de estimulación con TRH diferencia estas condiciones En el hipotiroidismo secundario, la respuesta de la TSH a la TRH se atenúa mientras que en el hipotiroidismo terciario se obtiene una respuesta normal o retardada. Además, la llegada de los ensayos inmunoenzimométricos ha proporcionado al laboratorio con suficiente sensibilidad para permitir la diferenciación de hipertiroidismo de población eutiroidea y extender la utilidad de las mediciones de TSH. Este método es un ensayo de segunda generación, que proporciona los medios para la discriminación (3).

Principio de Prueba:

Duración total del ensayo: 80 minutos.

- Las muestras, los micropocillos recubiertos con Anti-TSH y los anti-TSH etiquetados con enzimas están combinados.
- Durante la incubación, se permite que la TSH presente en la muestra reaccione simultáneamente con los dos anticuerpos, lo que da como resultado que las moléculas de TSH se intercalen entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas.
- Después del lavado, se genera un complejo entre la fase sólida, la TSH dentro la muestra y los anticuerpos ligados a enzimas por reacciones inmunológicas.
- La solución de sustrato luego se agrega y es catalizada por este complejo, lo que resulta en una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia.
- La absorbancia es proporcional a la cantidad de TSH en la muestra.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente con Anti-TSH monoclonal de ratón.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11 mL de HRP (peroxidasa de rábano picante) etiquetado Anti-TSH monoclonal de ratón en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (suero bovino albúmina). Contiene 0,1% de conservante ProClin300.
- Sustrato, 1 vial, 11ml, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 ml de ácido sulfúrico 1 mol/l.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.
- Se ha encontrado que todos los productos que contienen suero o plasma humano no son reactivos para HBsAg, HCV y HIV1/II. Pero todos los productos deben ser catalogados como peligros biológicos potenciales en uso y eliminación.
- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado.
- Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo. Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua. Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas médicas correctas.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C durante no más de 8 horas. Estable para 7 días a 2-8°C, y 1 mes a -20°C. Recuperación dentro del 90-110 % del valor del suero o pendiente 0.9-1.1. Congelar una sola vez.
- Los tipos de muestras enumerados se analizaron con una selección de tubos de recogida de muestras que estaban disponibles comercialmente en el momento de la prueba, es decir, no todos los disponibles. Se probaron tubos de todos los fabricantes. Sistemas de recolección de muestras de varios los fabricantes pueden contener diferentes materiales que podrían afectar los resultados de la prueba en algunos casos. Al procesar muestras en tubos primarios (obtención de muestras), siga las instrucciones del fabricante del tubo. Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación. algunas muestras, especialmente los de pacientes que reciben terapia anticoagulante o trombolítica, pueden aumentar el tiempo de coagulación. Si la muestra se centrifuga antes de formar coágulos completos, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos. Asegúrese de que las muestras no estén deterioradas antes de su uso.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.
- Tenga en cuenta que los niveles de interferencia de fibrina pueden estar presentes en muestras que no tienen partículas evidentes o visibles.
- Si no se puede verificar la recolección y preparación adecuada de muestras, o si las muestras han sido interrumpidas debido al transporte o manejo de las mismas. Se recomienda centrifugarlas. Las condiciones de centrifugado deben ser suficiente para eliminar las partículas.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos suavemente invertir antes de su uso.
- Ajuste la incubadora a 37°C.
- Prepare el concentrado de solución de lavado antes de la medición. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.
- No use el sustrato si se ve azul.
- No utilice reactivos que estén contaminados o que tengan crecimiento bacteriano.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado.

El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 40X):

Diluya 25ml de Solución de Lavado Concentrada en 975 mL de agua desionizada, para un volumen final de 1000 mL. Estable por 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar.
- Agregue 25 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 100 µL de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 60 minutos.
- Desear el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo.
- Incube a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad para que reaccione durante 20 minutos. No agite la placa después de agregar el sustrato.
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.

- Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color azul cambie a amarillo por completo.
 - Lea la absorbancia de cada pozo a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.
- Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en $\mu\text{U}/\text{mL}$ para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrado lineal.

Se sugiere el método de puntos para generar una curva de calibración.

Los siguientes datos son solo para demostración y no se pueden usar en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Muestra	Valor de la muestra ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	Absorbancia
Calibrador A	0	0.015
Calibrador B	0.5	0.108
Calibrador C	2.5	0.433
Calibrador D	7.5	1.106
Calibrador E	20	1.877
Calibrador F	40	2.826
Control 1	1.10	0.206
Control 2	8.76	1.184
Muestra	1.31	0.239

Limitaciones e Interferencia:

- El ensayo no se ve afectado por la ictericia (bilirrubina $< 600 \mu\text{mol}/\text{L}$ o $< 35 \text{ mg}/\text{dL}$), hemólisis ($\text{Hb} < 0,559 \text{ mmol}/\text{L}$ o $< 0,9 \text{ g}/\text{dL}$), lipemia (Intralipid $< 1200 \text{ mg}/\text{dL}$), y biotina $< 94 \text{ nmol}/\text{L}$ o $< 23 \text{ ng}/\text{mL}$.
- Criterio: Recuperación dentro del $\pm 10 \%$ del valor inicial.
- Los anticuerpos heterofílicos y los factores reumatoideos en las muestras pueden interferir con resultados de la prueba. Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con el reactivo inmunoglobulinas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro. Los pacientes rutinariamente expuestos a animales o productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y pueden observarse valores anómalos. La información adicional puede ser requerida para el diagnóstico. Este tipo de muestras no es adecuado para ser probado por este ensayo.
- No se ha establecido el rendimiento de esta prueba con muestras neonatales.
- No hay efecto de gancho de dosis alta en concentraciones de TSH de hasta $2000 \mu\text{U}/\text{mL}$. Se realizaron pruebas in vitro en 26 productos farmacéuticos de uso común.
- La presencia de autoanticuerpos puede inducir alto peso molecular complejos (macro-TSH) que puede causar valores altos inesperados de TSH.
- Pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón para cualquier diagnóstico o terapia puede desarrollar HAMA (anticuerpos anti-ratón humanos). HAMA puede producir valores falsos altos o bajos en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Es posible que se requiera información adicional para diagnóstico.
- Los valores de TSH en suero pueden elevarse mediante una intervención farmacológica. Domperidona, amidazon, yoduro, fenobarbital y fenitoína han sido reportados que incrementan los niveles de TSH.
- Se ha notificado una disminución de los valores de tirotrópina con la administración de propanolol, metimazol, dopamina y tiroxina. Variaciones genéticas o la degradación de TSH intacta en subunidades puede afectar las características de unión de los anticuerpos e influir en el resultado final. Tales muestras normalmente exhiben diferentes resultados entre varios sistemas de ensayo debido a la reactividad de los anticuerpos involucrados.
- Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse en conjunto con la historia clínica del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

Límites y Rangos:

Rango de Medición:

$0,02\text{-}40 \mu\text{U}/\text{mL}$ (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). La sensibilidad funcional es de $0,02 \mu\text{U}/\text{mL}$. Valores por debajo del límite de detección se reporta como $< 0,02 \mu\text{U}/\text{mL}$. Valores por encima del rango de medición se notifican como $> 40 \mu\text{U}/\text{mL}$.

Límites Inferiores de Medición:

Límite inferior de detección: $0,02 \mu\text{U}/\text{mL}$.

El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir desde cero. Se calcula como el valor que dan dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de reproducibilidad, $n=21$).

Valores Esperados:

$0,37 - 5,10 \mu\text{U}/\text{mL}$.

Estos valores corresponden a los porcentajes 2,5 y 97,5 de los resultados obtenidos de un total de 577 muestras de sujetos sanos examinados.

No hemos estudiado los intervalos de referencia en niños, adolescentes y mujeres embarazadas.

Cada laboratorio debe investigar la transferibilidad de los valores esperados a sus propias poblaciones de pacientes y, si es necesario, determinar sus propios rangos de referencia.

Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Resultados obtenidos en forma individual, los laboratorios pueden diferir.

Precisión:

La precisión se determinó utilizando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Instituto): 2 veces al día durante 20 días ($n = 40$). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Media $\mu\text{U}/\text{mL}$	Reproducibilidad		Precisión Intermedia	
		SD $\mu\text{U}/\text{mL}$	CV %	SD $\mu\text{U}/\text{mL}$	CV %
Suero 1	0.057	0.005	8.77	0.0052	9.12
Suero 2	0.44	0.024	5.46	0.03	6.82
Suero 3	3.11	0.146	4.69	0.20	6.43
PC Universal 1	1.63	0.088	5.40	0.09	5.52
PC Universal 2	7.86	0.321	4.09	0.42	5.34

*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución.

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo de TSH (y) con el Roche Cobas TSH (x) utilizando muestras dieron las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 121

Regresión Lineal.

$y = 1.003X - 0.629$

$r = 0.9780$

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 0 y $38 \text{ UI}/\text{mL}$.

Especificidad Analítica:

Para los anticuerpos monoclonales utilizados, se encontraron las siguientes reactividades cruzadas: LH 0,041 %, FSH 0,001 %; hGH y hCG sin reactividad cruzada.

Sensibilidad Funcional:

$0,05 \mu\text{U}/\text{mL}$.

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia del 20 %.

Efecto Gancho (Hook Effect):

No hay efecto de gancho de dosis alta en concentraciones de TSH hasta $1000 \text{ UI}/\text{mL}$.

Referencias:

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine."
2. *Journal Biological Chemistry*, 173, 175, (1984).

