

TurboTSH [I-125] IRMA KIT

RK-1CT1. Estuche para 100 determinaciones

Ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de la hormona estimulante de la glándula tiroidea (tirotropina, hTSH) en suero humano, en el rango de 0-100 $\mu\text{IU/mL}$.

Introducción

La hormona estimulante de la glándula tiroidea (hTSH, tirotropina) es una glicoproteína de 28000 Da segregada por la hipófisis anterior. Al igual que otras hormonas glicoproteicas (hFSH, hLH, HCG) la hTSH está compuesta por dos subunidades: α y β , unidas por enlaces no covalentes. La estructura de la subunidad α es prácticamente igual para las cuatro hormonas mencionadas, mientras que las unidades β se diferencian y son responsables por la actividad biológica de cada molécula.

La síntesis y secreción de la TSH es estimulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), producida en el hipotálamo y además está regulada por los niveles circulatorios de las hormonas tiroideas tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Las concentraciones elevadas de las hormonas tiroideas producen un descenso en la secreción de TSH, mientras que las concentraciones bajas llevan a un aumento en su secreción. El incremento de la concentración de TSH es el mejor y más temprano indicador del hipotiroidismo primario.

La determinación de las concentraciones séricas de TSH juega un papel fundamental en el diagnóstico y monitorización terapéutica de las enfermedades tiroideas y en la evaluación de la integridad funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.

Principio del ensayo

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítopes diferentes de la molécula. Uno de ellos está marcado con radioyodo (anticuerpo "señal") y el otro, no marcado, funciona como anticuerpo "captura".

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos ("sándwich") se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo durante un período de incubación de media hora. Después se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración de la hormona presente en el sistema. Utilizando calibradores de concentración conocida de hTSH se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de hTSH presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 12 mL, listo para usar, contiene < 980 kBq de anticuerpo monoclonal anti-hTSH marcado con ^{125}I y anti-hTSH biotinilado en solución tampón con 0,1 % NaN_3 y colorante rojo.

2. CALIBRADORES (S0-S100), 8 frascos listos para usar con 1 mL de suero equino con 0,1% NaN_3 . Los calibradores contienen: 0; 0,06; 0,15; 0,6; 2,5; 15; 50 y 100 $\mu\text{IU/mL}$ de hTSH y han sido calibrados contra el estándar de referencia WHO 3rd IRP 81/565.

3. SUERO CONTROL (CI-CII), 2 frascos listos para usar con 1 mL de suero humano con 0,1% NaN_3 . La concentración de los controles está especificada en el certificado de calidad incluido.

4. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (100 μL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (100 y 2000 μL). Jeringa automática (dispensador) para el lavado.

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 $^{\circ}\text{C}$ si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 5 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 $^{\circ}\text{C}$ después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente. Homogenizar completamente todos los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

Procedimiento para el ensayo

Nota: Cuando el KIT tiene menos de 3 semanas antes de la fecha de vencimiento o cuando se utiliza un procedimiento automatizado, el calibrador 0.06 $\mu\text{IU/mL}$ debe omitirse.

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para los totales (T), calibradores (S0-S100), controles (CI-CII) y muestras (M).
2. Añadir por duplicado 100 μL de calibrador, controles y muestras en los tubos apropiados, cuidando de no arañar el fondo del tubo.
3. Añadir 100 μL de trazador en cada tubo.
4. Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir

los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente (se recomienda como mínimo 600 rpm).

5. Incubar los tubos media hora en el agitador a temperatura ambiente (20 – 30 $^{\circ}\text{C}$).
6. Añadir 2 mL de agua destilada a cada tubo (excepto T). Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
7. Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 6.
8. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de hTSH en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1: protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S	C	M
Calibrador		100		
Control			100	
Muestra				100
Trazador	(100)	100	100	100
Agitar 30 minutos a temperatura ambiente				
Agua destilada		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Agua destilada		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Agua destilada		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

Cálculo de los resultados

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos. Restar de cada media el promedio de cpm obtenido para el calibrador de concentración cero (S0 = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S_x/C/M_x / (\text{cpm}) - S_0(\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de hTSH de cada estándar en un papel log-log.

Determinar la concentración de hTSH en las muestras basándose en las respectivas medias de cpm o en los valores B/T%, por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos, recomendamos el uso del programa de ajuste tipo spline, desarrollado especialmente para el análisis inmunoradiométrico. Existen programas que interpolan los valores que se encuentran entre el calibrador de concentración cero y el primer calibrador. Entre las concentraciones así calculadas, solo aquellas mayores que el límite de detección del ensayo pueden considerarse como reales (ver sensibilidad).

Tabla 2: resultados característicos

Tubos	Media(cpm)	B/T%
Total	375 646	
S0 (NSB)	160	
S0,06	275	0.03
S0,15	462	0.08
S0,6	1 233	0.29
S2,5	4 899	1.26
S15	26 309	6.96
S50	79 850	21.21
S100 (Bmax)	150 083	39.91
CI	1 991	0.49
CII	31 386	8.31

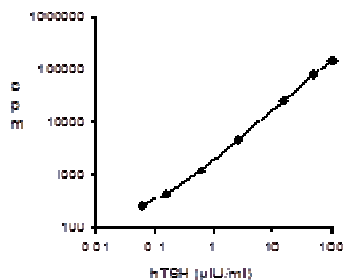


Figura 1: Curva estándar típica (No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!)

Características del ensayo

Sensibilidad

La *sensibilidad analítica* utilizando trazador fresco es de **0,009 μIU/mL**, calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 31 réplicas del calibrador cero.

Los límites de Blanco, Detección y Cuantificación se determinaron de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, documento EP17.

LoB = 0,015 μIU/mL determinado como el resultado máximo observado para una muestra blanco (de concentración cero).

LoD = 0,036 μIU/mL determinado con una proporción de falsos positivos (α) y falsos negativos (β) menor que 5 %, basado en 116 determinaciones, con 4 muestras blanco y 4 muestras de baja concentración.

LoQ = 0,070 μIU/mL, fue determinado gráficamente a partir de la curva del perfil de precisión. *LoQ = sensibilidad funcional*.

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 20 réplicas de 5 muestras, medidas en una serie.

Muestra	Media (μIU/mL)	CV%
1	1,91	1,85
2	2,37	2,41
3	8,39	1,19
4	19,84	1,68
5	45,86	1,21

Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 7 muestras, en 20 series independientes.

Muestra	Media (μIU/mL)	CV%
1	0,076	19,3
2	0,152	11,5
3	2,149	3,0
4	2,249	3,5
5	7,531	2,6
6	18,939	2,7
7	38,489	2,0

Especificidad

No se observa reacción cruzada detectable con las hormonas hLH, hCG y hFSH en concentraciones fisiológicas normales.

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 4 muestras con calibrador cero y se sometieron a ensayo. Se observó una recuperación media de 95,36 %.

Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los esperados (X):

$$Y = 1,0361x - 0,7669 \quad R^2 = 0,9994 \quad n = 16$$

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas a tres niveles de hTSH a 4 muestras de suero diferentes. Se obtuvo una recuperación media de 102,28%, con un rango entre 99% y 108%.

Valores de referencia

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia. Los valores que se proporcionan a continuación deben considerarse solo como informativos.

Rango de referencia eutiroideo:

$$0,3 \mu\text{IU/mL} - 4,0 \mu\text{IU/mL}$$

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición del hTSH en suero humano.
- Los resultados de este análisis deben ser utilizados conjuntamente a la información clínica pertinente.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de hTSH hasta 8000 μIU/mL. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 100-8000 μIU/mL se obtendrán valores superiores a 100 μIU/mL. Estas muestras deben ser diluidas con el calibrador de concentración cero y reanalizadas.
- Las muestras de pacientes que han recibido inmunoglobulinas de ratón con objetivo diagnóstico o terapéutico pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), cuya interferencia puede ocasionar resultados erróneos.

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

3) **Dosificación del agua destilada.** Para la adición del agua destilada se recomienda una jeringa automática o dispensador, equipado con un recipiente de 1 litro y un tubo flexible para la dosificación. En su ausencia puede utilizarse

una pipeta automática apropiada. Al decantar prestar cuidado de no contaminar el exterior de los tubos. Cualquier contaminación puede resultar en una sobre-estimación de la concentración. Este error es particularmente alto en el rango de concentraciones bajas.

Atención! No mezclar componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Todos los productos y derivados de origen animal provienen de animales saludables. No obstante, los componentes que contienen suero animal deben considerarse como *material potencialmente infeccioso*.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 22 mg de azida sódica.

	Fecha de vencimiento	LOT	Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C	CONTROL	Suero Control
	Precaución	CAL	Calibrador
	Peligro biológico	CT	Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones	TRAC	Trazador
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>	REF	Número de referencia
	Fabricante		Material radiactivo



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: +36 1 392-2577, Fax: +36 1 395-9247

Edición: Agosto/2018