

hTg [I-125] IRMA KIT

RK-51CT. Estuche para 100 determinaciones

Ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de la Tiroglobulina humana (hTg) en suero humano, en el rango de 0-250 ng/mL.

Introducción

La Tiroglobulina (hTg) es el principal componente de la sustancia coloide en los folículos tiroideos. La hTg es una glicoproteína heterogénea, cuya composición depende en parte del grado de yodación de la molécula. La forma molecular prevalente (660 kDa) es un dímero compuesto por dos subunidades unidas por enlaces no-covalentes. La hTg es el sitio de síntesis y almacenamiento de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄) y junto a ellas, parte de la hTg pasa a la circulación sanguínea bajo la estimulación de la tirotropina (TSH).

La determinación de la tiroglobulina en suero es fundamental como ayuda en la evaluación diagnóstica de los trastornos tiroideos, como la enfermedad de Graves, el adenoma benigno tiroideo, la tiroiditis de fase aguda y en el diagnóstico y seguimiento del carcinoma diferenciado de tiroides.

La sensibilidad del presente sistema hace posible la medición de niveles extremadamente bajos de hTg, haciendo posible su utilización como marcador precoz de recidiva tumoral.

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 15 a 24 horas. 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 hTg se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de hTg presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 21 mL, listo para usar, contiene < 980 kBq de anticuerpo monoclonal anti-hTg marcado con ¹²⁵I y anticuerpo monoclonal anti-hTg biotinilado en solución tampón con 0,1 % NaN₃ y colorante rojo.

2. CALIBRADORES (S1-S6), 6 frascos listos para usar con 1 mL de suero equino/porcino con 0,1% NaN₃. Los calibradores contienen: 0,3; 1; 4; 20; 100; 250 ng/mL de hTg y han sido calibrados contra el estándar de referencia BCR CRM 457.

3. SUERO CONTROL, 2 frascos listos para usar con 1 mL de suero equino/porcino con 0,1% NaN₃. La concentración de los controles está especificada en el certificado de calidad incluido.

4. DILUENTE (calibrador de concentración cero), 1 frasco con 5 mL de suero

equino/porcino, listo para usar. Contiene 0,1% NaN₃.

5. Suero de RECUPERACIÓN, 1 frasco con 1 mL de suero humano, listo para usar y calibrado contra el estándar de referencia BCR CRM 457.

Contiene 0,1% NaN₃. Su concentración está especificada en el certificado de calidad incluido.

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

7. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco, contiene 20 mL de solución concentrada. Diluir con 700 mL de agua destilada. Contiene 0,2 % NaN₃.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla fijadora para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (100, 200 y 2000 µL), mezclador vórtex, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (200 y 2000 µL). Jeringa automática (dispensador) para el lavado. Agitador orbital.

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 °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 °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 °C después de abiertos. A esta temperatura cada reactivo 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.

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 700 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

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.

Prueba de recuperación:

En el suero de algunos pacientes existen auto-anticuerpos Anti-Tg, los cuales pueden interferir en la determinación de la hTg (concentración más baja de la real). Para detectar esta interferencia se utiliza la prueba de recuperación, que debe ser realizada según se indica en el procedimiento del análisis.

La concentración del suero de recuperación (aproximadamente 500 ng/mL) debe ser verificada con el suero diluyente (tubos de referencia de recuperación, DR).

La recuperación en la muestra de suero se calcula como se indica a continuación:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{ng/mL Rx} - \text{ng/mL Mx}}{\text{ng/mL DR}} \times 100$$

Se aceptan valores de recuperación entre 70% y 130%. En el caso de valores <70% o >130%, no se consideran válidos los niveles de hTg medidos en la muestra original.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

- Rotular los tubos recubiertos por duplicado para los totales (T), el diluyente como calibrador cero (D), calibradores (S1-S6), controles (CI, CII), muestras (Mx), referencia de recuperación (DR) y muestras de recuperación (Rx)
- Añadir 10 µL de suero de recuperación en los tubos de referencia de recuperación (DR) y en los tubos de muestras de recuperación (Rx).
- Añadir por duplicado 100 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados. Añadir 100 µL de diluyente en los tubos de calibrador cero (D) y en los tubos de referencia de recuperación (DR). Añadir 100 µL de muestra en los tubos correspondientes de muestras de recuperación. Cuidar de no arañar el fondo de los tubos.
- Añadir 200 µL de trazador en cada tubo.
- Mezclar el contenido de cada tubo en vórtex, o alternativamente colocar la gradilla en un agitador orbital y agitar por algunos segundos. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno.
- Incubar los tubos durante 15 – 24 horas a temperatura ambiente.
- Añadir 2 mL de solución de lavado a cada tubo. 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.
- Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 7.
- Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de hTg en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	D	(S1-S6)	Mx	Rx	DR	(CI-CII)
Calibrador			100				
Muestra				100	100		
Control							100
Suero de Recuperación					10	10	
Diluyente		100				100	
Trazador	200	200	200	200	200	200	200
Incubar los tubos 15-24 horas a temperatura ambiente							
Solución de lavado	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente							
Repetir dos veces el paso de lavado y decantación							
Medir la radiactividad (60 s/tubo)							
Procesar los datos							

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

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 (D = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S1-6/C/Mx/Rx \text{ (cpm)} - D \text{ (cpm)}}{T \text{ (cpm)}} \times 100$$

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

Determinar la concentración de hTg 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 del ensayo

Tubos	hTg ng/mL	Conteos cpm	Media cpm	hTg ng/mL
T	-	393128 394123	393626	-
D (NSB)	0	167 178	171	-
S _{0,3}	0,3	552 559	556	-
S _{1,0}	1,0	1448 1476	1462	-
S _{4,0}	4,0	5517 5500	5509	-
S ₂₀	20	24756 24712	24734	-
S ₁₀₀	100	90031 90207	90119	-
S ₂₅₀	250	158821 162358	160590	-
CI	-	2458 2502	2480	1,99
CII	-	70250 70511	70380	69,8

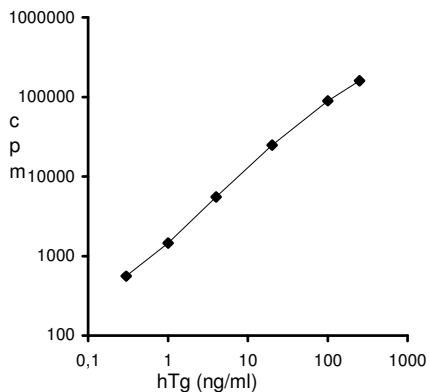


Figura 1
Curva estándar típica (No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!)

Características del ensayo

Sensibilidad

La sensibilidad analítica está calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 20 réplicas del calibrador de concentración cero. Utilizando un trazador fresco, la sensibilidad analítica es de 0,03 ng/mL. Con un trazador cercano a la fecha de vencimiento este valor se mantiene por debajo de 0,09 ng/mL.

La sensibilidad funcional se determinó a partir del perfil de precisión, utilizando 6 muestras de baja concentración, medidas en 20 análisis independientes. Utilizando un trazador fresco, la sensibilidad funcional es de 0,1 ng/mL. Con un

trazador cercano a la fecha de vencimiento este valor se mantiene por debajo de 0,3 ng/mL.

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente tres muestras con calibrador cero y se sometieron a ensayo. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):
 $Y = 0,9857X - 0,0949 \quad R^2 = 0,9989 \quad n = 12$

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas de hTg (solución preparada a partir del BCR CRM 457) a 23 muestras de suero diferentes. La recuperación obtenida fue de 99,0 ± 5,25% (media ± SD).

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 15 réplicas de 7 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 7 muestras, en 15 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (ng/mL)	CV %	Media (ng/mL)	CV %
118,7	1,9	117,8	2,7
85,4	2,2	86,2	1,9
11,4	1,8	11,5	2,2
5,9	2,6	6,0	1,7
4,9	2,0	5,1	2,0
1,3	2,7	1,3	3,0
0,7	5,9	0,7	6,3

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.

Adultos sanos: 2 – 70 ng/mL

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición del hTg 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 hTg hasta 10000 ng/mL. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 250 - 10000 ng/mL se obtendrán valores superiores a 250 ng/mL. Estas muestras deben ser diluidas con el calibrador de concentración cero (diluyente) y reanalizadas.

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) **Dosificación de la solución de lavado.** Para la adición de la solución de lavado 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.

Atención! No mezclar los 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 75 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>	WASHB	Tampón de lavado
	Fabricante		Material radiactivo
REF	Número de referencia	DIL	Diluyente
		REC	Suero recuperación



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/2019