

Inmunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de la Hormona Estimulante Tiroidea (TSH) en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo enzimático de TSH

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante tiroidea en suero humano.

INTRODUCCIÓN

La determinación de niveles en suero o plasma de la hormona estimulante tiroidea (TSH) es reconocida como un método sensible en el diagnóstico de hipotiroidismo primario y secundario. La TSH es secretada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria e induce la producción y liberación de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) desde la glándula tiroidea. Esta es una glicoproteína con un peso molecular de 28,000 daltons aproximadamente, consistiendo en dos subunidades químicamente diferentes, alfa y beta.

Aunque la concentración de TSH en sangre es extremadamente baja, ésta es esencial para el mantenimiento de la función tiroidea normal. La liberación de TSH es regulada por una hormona TSH-libre (TRH) producida por el hipotálamo. Los niveles de TSH y TRH están inversamente relacionados al nivel de la hormona tiroidea. Cuando existe un nivel alto de hormona tiroidea en sangre, menos TRH se libera por el hipotálamo, por lo que al menos TSH es secretada por la pituitaria. La acción opuesta puede ocurrir cuando es disminuida la hormona tiroidea en sangre. Este proceso es conocido como un mecanismo de regeneración negativa y es responsable para mantener los niveles apropiados de estas hormonas en sangre. La TSH y la glicoproteínas pituitarias: la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo-estimulante (FSH), y la gonadotropina coriónica humana (hCG), tienen cadenas idénticas alfa. Las cadenas beta son distintas pero contienen regiones con secuencias idénticas de aminoácidos. Estas regiones de homología pueden causar considerables reacciones cruzadas con algunos antisueros policlonales de TSH. El uso de un anticuerpo monoclonal en esta prueba ELISA TSH elimina tal reactividad cruzada que podría producir valores de TSH falsamente elevados en mujeres menopáusicas o embarazadas en poblaciones cuya evaluación de un estado tiroideo es de importancia clínica.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba ELISA TSH está basada en el principio de la fase sólida de la enzima-unida a un ensayo inmunoabsorbente. El sistema del ensayo utiliza un único anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno distinto determinante en la molécula de TSH intacta. El anticuerpo anti-TSH ratón monoclonal es usado para la inmovilización de la fase sólida (en los micro pozos). Un anticuerpo de anti-TSH de cabra está en la enzima-anticuerpo (peroxidasa de rábano picante) de la solución conjugada. La muestra de la prueba es permitida que reaccione simultáneamente con los dos anti-

cuerpos, mientras se producen las moléculas de TSH intercalándose entre la fase sólida y los anticuerpos unidos a la enzima. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavan con agua para quitar los anticuerpos etiquetados desprendidos. Una solución TMB es agregada e incubada durante 20 minutos, resultando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de Solución de Paro cambiando el color a amarillo. La concentración de TSH es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de la prueba. La absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450 nm.

REACTIVOS**Materiales proporcionados con el equipo:**

1. Pocillos de microtitulación recubiertos de anticuerpos. 96 pozos
2. Reactivo de Enzima Conjugada.
3. Estándares de referencia: 0, 0.5, 2, 5, 10, 20 y 40 µU/mL. En forma líquida (listo para su uso) o Liofilizados.
4. Reactivo de TMB
5. Solución de Paro (1N HCl)
6. Solución búfer concentrada (50X)
7. Instructivo de uso

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 40 µL - 200 µL, 200 µL - 1,000 µL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

El suero debe obtenerse a partir de una muestra de sangre entera recolectada por técnicas médicas aceptables. Este kit es para uso con muestras de suero sin aditivos.

ALMACENAMIENTO DEL KIT E INSTRUMENTACIÓN

1. El kit de prueba sin abrir debe almacenarse a 2 - 8 ° C al ser recibido y la placa de microtitulación debe mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo. El kit de ensayo puede utilizarse hasta la fecha de caducidad del equipo. Consulte en la etiqueta del kit la fecha de caducidad .
2. Los kits de prueba abiertos permanecerán estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre y cuando sean almacenados como antes se describió.
3. Un lector de placas de microtitulación con un ancho de banda de 10nm o menos y un rango de densidad óptica de 0-2 DO o mayor a 450 nm de longitud de onda es aceptable para uso en la medición de la absorbancia.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18 a 22 °C) antes de su uso.
2. En caso de estar los controles liofilizados, reconstituya cada estándar-



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
 Ruddyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
 CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

dar liofilizado con 0.5 mL de agua destilada. Permita que el material reconstituido repose por al menos 20 minutos y mezcle cuidadosamente. Los estándares reconstituidos serán estables por 30 días siempre y cuando sean almacenados de 2-8°C.

3. Diluir un volumen de solución búfer concentrado (50X) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 ml de solución búfer concentrado (50X) en 735 ml de agua destilada para preparar 750 ml de búfer de lavado (1X). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en la placa.
2. Dispense 50 µL, de estándares, muestras y controles dentro de los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µL del Reactivo de la Enzima Conjugada en cada pozo.
4. Mezcle perfectamente durante 30 segundos. Es muy importante hacer la mezcla completa.
5. Incubar a temperatura ambiente (de 18 a 22°C) durante 60 minutos.
6. Retire la mezcla de la incubación golpeando el contenido de la placa a un recipiente de desechos.
7. Enjuague y de pequeños golpes a los micro pozos 5 veces con búfer de lavado (1X).
8. Golpee los pozos firmemente en el papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales.
9. Deposite 100 µL de Solución de TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente durante 5 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente durante 20 minutos.
11. Detenga la reacción agregando 100 µL de Solución de paro a cada pozo.
12. Mezcle cuidadosamente durante 30 segundos. **Es importante asegurarse que el color azul cambie a amarillo completamente.**
13. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector del micropozos **en un plazo no mayor a 15 minutos.**

NOTA IMPORTANTE:

- 1) El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
- 2) Durante los procesos de ensayo, se recomienda añadir sustrato TMB a uno o dos pozos como blanco (s).

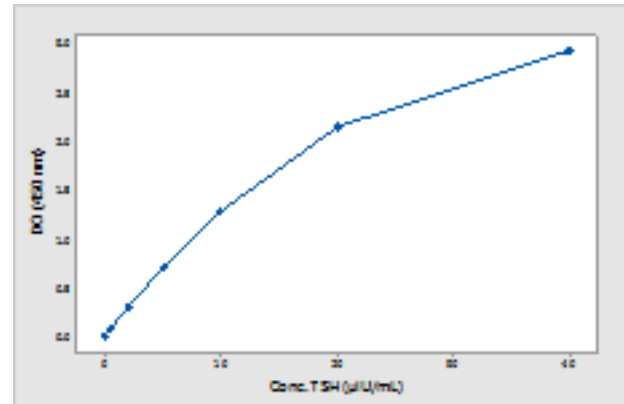
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras de pacientes. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en µIU/mL sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y ó vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de TSH en µIU/mL desde la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Resultados típicos de una corrida estándar del ensayo se muestran a continuación. Esta curva estándar tiene el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. La curva estándar cubre un rango dinámico desde 0 hasta 40 µIU/mL.

TSH (µIU/mL)	Absorbancia (450 nm)
0.0	0.011
0.5	0.099
2.0	0.313
5.0	0.715
10.0	1.287
20.0	2.156
40.0	2.937



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

La media de valores de TSH en base a 160 muestras de sangre de adultos normales tomados al azar es de 1.6 (0.4 - 7.0) µIU/mL. La concentración mínima detectable de TSH por este ensayo esta estimada en 0.2 µIU/ml.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, sólo debe ser realizada por el médico después de que los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados.
2. Los estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados de inmunoensayo en algunos pacientes que presentan factor reumatoide y anticuerpos antinucleares. Las muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón para fines de diagnóstico o terapéuticos, pueden contener anticuerpos frente a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no se puede garantizar la eliminación de todos los efectos de esta.

REFERENCIAS

1. Soos, M. and Siddle, K., *J Immun. Methods*, 1982; 51: 57-68
2. Wada, H. G, Oanisch, R J, Baxter, S. R, et al, *Clin. Chem.*,28, 1862-1866 (1982).
3. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E, *J Immunol. Methods*, 42,11-15 (1981).
4. Burger, H, G., Patel, Y, C., *Thyrotropin releasing hormone-TSH Clinic. Endocrinol. and Metab.* 6, 831-00(1977).
5. Snyder, P. J & Utiger, R O, *J Clin. Endo. Metab.*, 34, (1972).