



# RecombiLISA

## Prueba ELISA Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH)

IVD REF E1030

- Prueba ELISA de 96-pozos para la determinación cuantitativa de TSH en suero o plasma humanos
- Solo para exportación, no para la reventa en los Estados Unidos
- Al recibir este producto almacene a temperatura de 2-8°C

### USO

La Prueba ELISA *RecombiLISA* TSH es un ensayo inmunoenzimático inmunoadsorbente en fase sólida para la determinación cuantitativa del nivel de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero o plasma humanos. Esta prueba está diseñada para ser usada por profesionales en el diagnóstico de la disfunción tiroidea.

### INTRODUCCIÓN

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) en humanos es sintetizada por las células basófilas (tirotrópos) de la pituitaria anterior<sup>1</sup>. Está compuesta por dos subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  enlazadas por enlace no covalente. La estructura de la subunidad  $\alpha$  es similar a la de la hormona luteinizante (LH), la hormona foliculo estimulante (FSH), y la gonadotropina coriónica humana (hCG). La subunidad  $\beta$  es específica para hormonas y confiere especificidad tanto biológica como inmunológica<sup>2</sup>. Para la actividad biológica se requieren las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La TSH estimula la producción y secreción de las hormonas tiroideas metabólicamente activas, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). La T4 y la T3 son responsables de regular diversos procesos bioquímicos en el cuerpo esenciales para el desarrollo normal, así como para la actividad metabólica y neuronal<sup>3</sup>.

El eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT) se establece a través de la comunicación y retroalimentación entre el hipotálamo, la glándula pituitaria, y la tiroides. La síntesis y secreción de TSH por la pituitaria anterior es estimulada por la hormona hipotálamica productora de tirotrópina tripeptídica (HPT), la cual es producida por el hipotálamo en respuesta a bajos niveles de T4/T3 en el sistema circulatorio. Cuando el hipotálamo percibe que los niveles de las hormonas T4/T3 han vuelto a nivel normal, son inhibidas el HPT y TSH. El hipotálamo además puede inhibir la producción de TSH a través de los efectos de la somatostatina y la dopamina. Una falla a cualquier nivel en la regulación de HPT resultará en ya sea baja producción (hipotiroidismo) o sobreproducción (hipertiroidismo) de T4 y/o T3.

Datos recientes de estudios realizados con poblaciones grandes han demostrado que el nivel promedio de TSH en la población general es de aproximadamente 1.50  $\mu$ U/mL (95% intervalo de confianza 1.46-1.54  $\mu$ U/mL)<sup>4,5</sup>. En los Estados Unidos, el hipotiroidismo ocurre en aproximadamente el 4.6% de la población de adultos, y el hipertiroidismo se presenta en un 1.3% de la población<sup>6</sup>. La mayoría de los médicos consideran que los niveles de TSH > 5-10  $\mu$ U/mL son evidencia de hipotiroidismo ligero o subclínico mientras que los niveles de TSH < 0.2-0.4  $\mu$ U/mL son evidencia de hipertiroidismo<sup>7</sup>. Sin embargo, es importante que cada institución establezca su propio intervalo de referencia de TSH basado en un muestreo representativo de la población local.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Prueba ELISA *RecombiLISA* TSH es un ensayo inmunoenzimático inmunoadsorbente en fase sólida basada en la técnica de anticuerpo de sandwich para la determinación cuantitativa de TSH en suero o plasma humanos.

La Prueba ELISA *RecombiLISA* TSH está compuesta por dos componentes clave:  
 1) Micropozos sólidos pre-cubiertos con anticuerpos monoclonales anti-TSH, específicos para la subunidad  $\beta$ .  
 2) Conjugados líquidos compuestos de anticuerpos monoclonales específicos para TSH no-intacto, a su vez conjugados con peroxidasa de rábano picante (conjugados HRP-anti-TSH).

Durante el ensayo, el espécimen a probar y los conjugados HRP-anti-TSH se incuban simultáneamente en la placa de micropozos recubiertos. El TSH, si se encuentra presente en el espécimen, reacciona con el anticuerpo anti- $\beta$  TSH que recubre la superficie del micropozo además de reaccionar con los conjugados HRP-anti-TSH, formando un inmunocomplejo de anticuerpo tipo sándwich.

Los conjugados no reaccionados se remueven por medio de un lavado. La presencia del complejo conjugado se observa por el desarrollo de un color azul después de incubar por más tiempo con el sustrato. La reacción se detiene con la

adición de Solución de Parada y la absorbancia es determinada utilizando un espectrofotómetro a 450/620-690 nm.

Se prepara una curva estándar al graficar la absorbancia a 450/620-690 nm versus la concentración respectiva de TSH para cada estándar. La concentración de TSH en las muestras se determina basándose directamente en esta curva.

### MATERIALES Y REACTIVOS

#### Materiales y reactivos incluidos en el kit

No.	Descripción	Cantidad	Catálogo
1	Tiras pre cubiertas Anti-TSH	8 pozos x 12 tiras	E1030W
2	Soluciones estándar de TSH: S1 (0 $\mu$ U/mL)	1 mL	E1030S1
3	S2 (0.5 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S2
4	S3 ( 2 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S3
5	S4 ( 5 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S4
6	S5 (10 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S5
7	S6 (20 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S6
8	S7 (40 $\mu$ U/mL)	0.75 mL	E1030S7
9	Conjugados HRP-anti-TSH	6 mL	E1030H
10	Sustrato TMB	12 mL	TME2001
11	Solución tampón de lavado (Concentrado 30X)	20 mL	WE3001
12	Solución de parada	13 mL	SE1001
13	Inserto del producto	1	PI-E1030
14	Hoja de trabajo ELISA	2	E0001ES

Además: 2 x selladores de microplaca y 1 x bolsa resellable

#### Materiales y reactivos requeridos, pero no incluidos en el kit

1. Pipeta capaz de proporcionar 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, y 1 mL con precisión mayor del 98.5%
2. Lector de placa de micropozo con ancho de banda de 400 nm o menos y un rango de densidad óptica de 0-2 DO o mayor a longitud de onda de 450/620-690 nm es aceptable
3. Agitador de vórtice o equivalente
4. Papel absorbente para absorción de líquidos de los micropozos
5. Papel cuadrículado
6. Cronómetro
7. Agua destilada o desionizada

### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos, con excepción de la solución tampón para lavado, se suministran listos para su uso. Almacene todos los componentes a 2-8°C. No congele los reactivos y evite exposiciones a luz intensa. Después de extraer las placas de micropozos necesarios para uso inmediato, guarde las restantes en las bolsas de plástico selladas. Asegure que los reactivos estén a temperatura ambiente antes de abrir los paquetes. Todos los reactivos serán estables en paquetes no abiertos hasta la fecha de caducidad indicada en el empaquetado. Mantenga las placas de micropozos no usadas a temperatura de 2-8°C en las bolsas resellable incluidas. Una vez abiertos los reactivos, estos se mantendrán estables por un periodo de 2 meses almacenados a 2-8°C, o hasta la fecha de caducidad indicada (se aplicará la fecha más temprana).

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

#### Para Uso Laboratorio *in Vitro*

1. Este inserto debe ser leído completamente antes de realizar la prueba. El no cumplir con estas instrucciones producirá resultados erróneos.
2. No use este kit después de la fecha de caducidad.
3. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usarlos.
4. No sustituya los componentes incluidos en este kit con componentes de otro tipo de kit
5. No utilice suero derivado de especímenes de sangre hemolizada para esta prueba
6. No ingiera los reactivos. Evite contacto con los ojos, piel, y boca. Utilice ropa protectora y guantes desechables mientras manipula los reactivos del kit y especímenes clínicos. Lávese bien las manos después de ejecutar el ensayo.
7. No fume, beba, ni coma en las áreas donde se estén manipulando especímenes o utilizando los reactivos del kit.
8. Los usuarios de este kit deberán seguir las Precauciones Universales del CDC de los Estados Unidos para la prevención de la transmisión de VH, VHB, y otros patógenos transmitidos por vía sanguínea.
9. Deseche todas los especímenes y materiales utilizados en esta prueba como residuos biológicos peligrosos.
10. Al inicio de cada incubación y después de agregar Solución de Parada, mueva suavemente las microplacas para asegurar un buen mezclado. Evite la formación de burbujas, las cuales resultan en valores de absorbancia incorrectos. Evite salpicar líquidos mientras se agitan las microplacas.
11. No permita que las microplacas se sequen durante el periodo después del lavado y antes de la aplicación del reactivo.

12. La reacción enzimática es muy sensible a la presencia de iones metálicos. Por eso, no permita que haya contacto entre cualquier elemento metálico y el conjugado o el sustrato TMB.
13. El sustrato TMB debe ser incoloro. La apariencia de color indica que el reactivo no debe ser usado y deberá ser reemplazado con reactivo nuevo. El sustrato TMB deberá ser almacenado en la oscuridad.
14. Utilice una punta de pipeta nueva para cada espécimen. Nunca use el recipiente del espécimen para la distribución del conjugado o el sustrato TMB.
15. El proceso de lavado es crítico. Los micropozos deben ser aspirados completamente antes de agregar la solución tampón o reactivos líquidos. Un lavado insuficiente puede resultar en baja precisión y valores falsos de absorbancia elevados.
16. Evite la exposición a la luz fuerte durante el desarrollo del color.

### COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

- El suero o plasma deberá ser preparado a partir de muestras de sangre enteramente contenida a través de técnicas de venipunción aceptable.
- Este kit está diseñado para ser usado solamente con especímenes de suero sanguíneos.
  - Si un espécimen no es utilizado inmediatamente, refrigérela a 2-8°C. Si se prevé un periodo de almacenamiento mayor de tres días, el espécimen deberá ser congelado (-20°C). Evite la congelación/descongelación de la muestra repetida de las muestras. Si un espécimen será transportado, empáquele según los reglamentos Federales pertenecientes al transporte de agentes etiológicos
  - Los especímenes con precipitados pueden producir resultados no consistentes. Clarifique tales especímenes por medio de la centrifugación antes de realizar el ensayo.
  - No utilice especímenes de suero o plasma que muestren alto grado de lipemia, hemólisis, o turbidez. No utilice especímenes que contengan azida de sodio.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS ANTES DEL ENSAYO

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. **Preparación de la solución de trabajo de Enjuague Tampón:** Si se observan precipitados, aumente la temperatura de la solución tampón (concentrado 30X) hasta 37°C. Diluya el enjuague tampón 30X de la siguiente manera:

Placa	Agua DI	Enjuague tampón 30 X	Volumen final
Placa llena	580 mL	20 mL	600 mL
Media placa	290 mL	10 mL	300 mL
Cuarto de placa	145 mL	5 mL	150 mL

3. Agite cada reactivo antes de agregarlo a los pozos en la microplaca.
4. Determine el número de tiras necesarias para el ensayo y anote esa información en la ficha u hoja de trabajo de ELISA. Se deberán correr concentraciones estándar por duplicado para asegurar mayor exactitud. Diluya aquellas muestras que contengan concentración de TSH mayor que 40  $\mu$ U/mL con una cantidad apropiada de estándar S1. Mezcle muy bien las muestras diluidas antes de proceder con el ensayo.

### PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO

1. Tome el numero deseado de tiras y sujételas en el soporte de la microplaca. Ponga las tiras no usadas en la bolsa resellable y selle la bolsa.
2. A cada micropozo, según el plan de trabajo, agregue ya sea 50  $\mu$ l de solución estándar TSH, solución control, o solución de espécimen del paciente.
3. Agregue 50  $\mu$ l de la solución conjugada de HRP-anti-TSH a todos los micropozos, pero no a los micropozos vacíos.
4. Agite suavemente la microplaca por 30 segundos y después cúbrala con un sellador de microplaca.
5. Incuba las microplacas a 37°C por 60 minutos.
6. Cuidadosamente remueva la solución de incubación a un recipiente de desecho. Llene cada micropozo con solución de enjuague tampón y agite suavemente por 20-30 segundos. Deseche la solución de enjuague completamente. Repita exactamente 4 veces más. Después de completar el último enjuague, golpee suavemente la placa contra papel absorbente para remover el líquido residual.
7. Agregue 100  $\mu$ l de sustrato TMB a cada micropozo, incluyendo el micropozo en blanco, y agite suavemente.
8. Incube a temperatura ambiente (20-25°C) en la oscuridad por 20 minutos.
9. Detenga la reacción al agregar 100  $\mu$ l de Solución de Parada a cada pozo. Mezcle suavemente por 30 segundos. **Es importante asegurar que el color azul cambie completamente a color Amarillo**

10. Ajuste la longitud de onda del lector de microplacas a 450 nm y determine la absorbancia (DO) de cada pozo comparando cada uno contra la absorbancia del pozo vacío. Todas estas mediciones deberán completarse dentro de los 15 minutos después de detener la reacción con Solución de Parada. Un filtro de longitud de onda de 620-690 nm se puede usar como referencia para optimizar los resultados del ensayo.

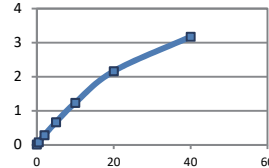
#### CÁLCULO DE RESULTADOS

- Calcule el valor promedio de la absorbancia ( $A_{450/620-690}$ ) para cada juego de soluciones estándar. En caso de haber usado un blanco, reste el valor de la absorbancia del pozo vacío del valor promedio de la absorbancia del juego de soluciones estándar.
- Usando papel cuadrulado, construya una curva estándar al graficar el valor promedio (o promedio menos el blanco) para cada uno de las soluciones estándar contra su concentración respectiva, poniendo los valores de absorbancia en el eje Y vertical y las concentraciones en el eje X horizontal.
- Utilice el valor de absorbancia (o su valor menos el blanco) para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de TSH en unidades de  $\mu\text{U/ml}$ , basándose en la curva estándar. *En forma alternativa, puede calcularse la concentración de TSH utilizando el menú del software.*
- Aquellos valores obtenidos a partir de una muestra diluida tendrán que ser corregidos al aplicar el factor de dilución en el cálculo.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Abajo se muestran resultados de una curva estándar típica:

TSH ( $\mu\text{U/ml}$ )	A450/620-690
0.0	0.012
0.5	0.077
2.0	0.286
5.0	0.665
10	1.233
20	2.163
40	3.175



#### VALOR NORMAL ESPERADO

1. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores normales basándose en un muestreo representativo de la población local. Los valores presentados abajo para TSH se deben utilizar solamente como una guía inicial:

Classification	Numero	Promedio TSH ( $\mu\text{U/ml}$ )	Rango <sup>5</sup>
Normal	231	1.50	0.45-4.12
Hipotiroidismo	16	11.20	> 5.0
Hipertiroidismo	3	0.12	< 0.2

#### DESEMPEÑO

##### 1. Sensibilidad de detección

La sensibilidad analítica se define como la concentración correspondiente a la media de 20 repeticiones del estándar S1. El resultado se presenta como promedio de la sensibilidad de 3 lotes al 95% de nivel de confianza:  $0.035 \pm 0.012 \mu\text{U/ml}$ .

##### 2. Especificidad Analítica

La especificidad del método para TSH fue determinada al añadir concentraciones altas de hCG, FSH, y LH en dos muestras mezcladas de suero humano. Cada una de las muestras enriquecidas con estos compuestos fue comparada con una muestra no adulterada. Los resultados no mostraron reactividad cruzada con hCG, FSH, y LH en las concentraciones probadas.

Sustancia	Relación de reactividad cruzada	Concentración
hTSH	1.00	-
hCG	$<1 \times 10^{-5}$	200,000 mIU/ml
FSH	$<1 \times 10^{-5}$	500 mIU/mL
LH	$<1 \times 10^{-5}$	500 mIU/mL

##### 3. Exactitud

En un total de 156 especímenes, los niveles de TSH fueron determinados por el método Roche E601TSH Chemiluminescent Immunoassay and Prueba ELISA *RecombILISA* TSH. Los resultados se presentan como el promedio de los resultados de 3 grupos con un 95% de intervalo de confianza.

Análisis de Regresión		Coeficiente de Correlación
Pendiente	Intersección	
$0.991 \pm 0.09$	$0.122 \pm 0.122$	$0.986 \pm 0.004$

#### 4. Precisión

- a. La precisión intra-ensayo fue determinada al realizar un análisis con 20 repeticiones provenientes de tres grupos de pacientes.

Panel	N	Promedio ( $\mu\text{U/ml}$ )	DE	%CV
Bajo	20	0.597	0.034	5.8
Medio	20	4.817	0.418	8.7
Alto	20	19.747	1.538	7.8

- b. La precisión inter-ensayo fue determinada al realizar análisis por duplicado de tres grupos de pacientes en 10 corridas separadas, utilizando una curva estándar nueva para cada corrida. Un resumen de los resultados se presenta en la tabla siguiente:

Panel	úmero de Pruebas	Promedio ( $\mu\text{U/ml}$ )	DE	%CV
Bajo	10	0.397	0.035	8.9
Medio	10	4.800	0.367	7.6
Alto	10	31.118	2.005	6.4

#### 5. Efecto Gancho

No se observó Efecto Gancho a concentraciones de TSH de hasta 8,000  $\mu\text{U/ml}$ .

#### 6. Interferencia

Sustancias comunes (como analgésicos, antipiréticos, y componentes de la sangre) podrían afectar el rendimiento del Prueba ELISA *RecombILISA* TSH. Esto fue estudiado mediante la adición de estas sustancias a dos agrupaciones de suero humano categorizadas como normal y elevado en nivel de TSH, respectivamente. Los resultados demostraron que, a las concentraciones ensayadas, las sustancias estudiadas no afectan el desempeño del Prueba ELISA *RecombILISA* TSH.

Lista de sustancias potencialmente interferentes y concentraciones ensayadas:

1. Acetaminofeno	1324 $\mu\text{M}$	6. Diazepam	15 $\mu\text{M}$
2. Eritromicina	81.6 $\mu\text{M}$	7. Hemoglobina	2 g/dL
3. Verapamil	4.4 $\mu\text{M}$	8. Bilirrubina	20 mg/dL
4. T3	100 ng/mL	9. fT4	52.5 ng/mL
5. T4	100 $\mu\text{g/L}$	10. fT3	215 UI/mL

#### CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren la inclusión de especímenes de control de calidad (controles) en cada curva de calibración para verificar el desempeño correcto del ensayo. No se puede usar un control que contenga azido de sodio. Cualquier material utilizado para este fin deberá ser ensayado repetidamente por el establecimiento de valores promedio y rangos aceptables para asegurar el desempeño correcto del kit. Este kit no incluye controles de suero.

#### LIMITACIONES DEL ENSAYO

- El Procedimiento de Ensayo y la Interpretación de los Resultados deberán ser seguidos estrictamente al analizar los niveles de TSH en especímenes de suero de sueros individuales. Si no se siguen los procedimientos indicados pueden generarse resultados inexactos.
- El Prueba ELISA *RecombILISA* TSH se limita a la detección cuantitativa de TSH en suero o plasma humano.
- El ensayo para TSH no puede ser usado para detectar una enfermedad pituitaria y/o hipotalámica, ya que es posible que no pueda distinguir entre isoformas normales y anormales de TSH presentes en estas enfermedades.
- Otras enfermedades no-tiroideas también pueden cambiar el metabolismo hormonal de la tiroides y la función hipotalámica/tiroidea, resultando en menor o mayor niveles de TSH.
- El diagnóstico exacto de la función tiroidea depende de la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), tiroxina libre (fT4), triyodotironina libre (fT3), receptor anticuerpo anti-TSH, y una evaluación de la historia clínica del paciente. La determinación sola de TSH no puede ser usada para pronosticar el desarrollo clínico del paciente.
- Cualquier interpretación o uso de este ensayo deberá depender también de otros hallazgos clínicos además de la opinión profesional de proveedores de salud.

#### REFERENCIAS

- Burger, H. G., Patel, Y. C., Thyrotropin releasing hormone –TSH Clin. Endocrinol. and Metab., 6, 83-100 (1977).
- Ezrin, C., The Thyroid, S. C. Werner and S. H. Ingbar (eds.), Harper and Row, Hagerstown, MD, 9, 174-178 (1978).
- Boelaert K. and Franklyn J. A. Thyroid hormone in health and disease. Journal of Endocrinology 187:1-15 (2005).

- Kratzsch J, Fielder G. M, Leichtle A et al. New reference interval for thyrotropin and thyroid hormones based on National Academy Clinical Biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid. Clinical Chemistry, 51(8):1480-1486, (2005).
- Hollowell J. G, Staehling N. W, Flander W. D, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). J Clin Endocrinol Metab, 87(2):489-499 (2002).
- Vanderpump M. P. J. The epidemiology of thyroid disease. British Medical Bulletin, 39:5-11 (1991).
- Brabant G, Beck-peccard J, Jarzab B, et al. Is there a need to redefine the upper normal limit of TSH. Eur J Endocrinol, 154(5):644-637 (2006).

#### Índice de Símbolos

	Ver instrucciones de uso		Almacenar de 2 a 8°C
	Solamente para uso diagnóstico		Vencimiento
	Número de catálogo		Estándar
	Número de lote		Conjugados
	Pruebas por kit		Sustrato TMB
	No reutilizar		Solución de Parada
	Fabricante		Tampón de Lavado
	Fecha de manufactura		Pozos recubiertos
	Representante autorizado		

**CTK Biotech, Inc.**  
 10110 Mesa Rim Road,  
 San Diego, CA 92121  
 Tel: 858-457-8698  
 Fax: 858-535-1739  
 E-mail: info@ctkbiotech.com

**MDSS GmbH**  
 Schiffgraben 41,  
 30175 Hannover, Germany  
 PI-E1030-Spanish Rev. H  
 Fecha de publicación: 2017-09-29