
INTERÉS CLÍNICO

Los niveles normales de las hormonas tiroideas son imprescindibles para un adecuado desarrollo físico y mental desde los primeros momentos de la vida (1). Su determinación tiene una importancia esencial como indicador del estado funcional tiroideo y puede ser especialmente utilizada en el diagnóstico precoz del Hipotiroidismo Congénito (2). Esta enfermedad constituye la causa más frecuente de retardo mental evitable en el niño, con una frecuencia aproximada a nivel mundial de 1:4000 recién nacidos (3). El déficit en la producción o utilización de las hormonas tiroideas produce alteraciones irreversibles del desarrollo del Sistema Nervioso Central, que solamente puede prevenirse con una terapia sustitutiva de hormonas tiroideas en los primeros momentos de la vida (4,5). La detección clínica del Hipotiroidismo Congénito en los recién nacidos es casi imposible ya que sus síntomas son muy subjetivos y escasos, por lo que el diagnóstico sólo es posible determinando la concentración en sangre de Tiroxina (T4) o de la hormona estimulante del tiroides (TSH). Por esta razón diversos programas destinados al pesquiasaje de Hipotiroidismo Congénito se basan en la determinación de T4 en muestras de sangre de talón colectadas sobre papel de filtro (6).

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA T4 NEONATAL es un ensayo inmunoenzimático competitivo para la determinación de Tiroxina total en sangre seca colectada en papel de filtro, donde el antígeno natural y el antígeno marcado con una enzima compiten por una cantidad limitada de sitios de unión al anticuerpo (7). En este ensayo se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas previamente con anticuerpos Anti-T4, lo cual garantiza la especificidad del ensayo.

Las manchas de sangre seca se eluyen con la solución que contiene el Conjugado T4/Fosfatasa Alcalina (F.A.) y el eluato se deposita en los pocillos de las tiras de reacción. Se procede a la incubación de las mismas para permitir la formación del complejo anticuerpo-antígeno-enzima. La realización de un lavado posterior elimina el Conjugado no fijado y los otros componentes de la muestra. Al añadir el Sustrato fluorogénico (4-Metilumbelíferil fosfato), éste resultará hidrolizado por la enzima del Conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será inversamente proporcional a la concentración de Tiroxina presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO. Código UM 2125 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
Tarjeta con Calibradores y Control en sangre seca	3 x 3 curvas
R1: Solución Tampón	1 x 25 mL
R2: Tampón Conjugado	3 x 10 mL
R3: Conjugado	1 x 1 mL
R4: Sustrato	1 x 2 mL
R5: Tampón Sustrato	1 x 18 ml

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primero representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Los Calibradores y el Control han sido preparados con sangre humana, dispensados en papel de filtro **S&S 903**, con un valor de hematocrito del 55 %.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como agente preservante.

Los Calibradores y el Control son negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, HBsAg, anti-VHC y Sífilis, no obstante, deben ser manipulados como materiales potencialmente infecciosos.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para 4 tiras de reacción, diluya 2 mL de R1 hasta un volumen de 50 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma.

R3: Para 4 tiras de reacción, diluya 0,075 mL de R3 con 3 mL de R2. Homogeneice cuidadosamente.

R4: Diluya 1:10 con R5. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 2 mL (0,2 mL de R4 + 1,8 mL de R5). Prepare inmediatamente antes de usar.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C, en esas condiciones serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba. No se recomienda la conservación de los reactivos reconstituidos por un tiempo superior a los requerimientos de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses entre 2 y 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Probeta graduada de 150 mL.
- Placas o tubos de ensayo para la elución de los ponches.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a una temperatura de 20 a 25 °C.
- Manipule los Calibradores, el Control y las muestras como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro **S&S 903** no deben permanecer a una temperatura de 20 a 25 °C por más de una semana. Almacenadas entre 2 y 8 °C son estables durante cuatro meses (8).
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con la muestra como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Las tiras de reacción deben estar a una temperatura de 20 a 25 °C antes de retirarles la cubierta protectora.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
- Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las muestras y reactivos una vez aplicados, deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
- Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir los calibradores, el control y las muestras, debe lavar profusamente sus puntas para evitar la contaminación, al menos un lavado de cinco ciclos con

solución de trabajo R1 y un lavado de cinco ciclos con agua destilada. Deseche la solución y el agua destilada después de cada lavado.

-Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.

-Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.

-El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

-Los reactivos del UMELISA T4 NEONATAL de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.-Preparación de los Calibradores, el Control y las muestras.

Corte con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Deposítelo en un recipiente apropiado y añádale 60 μ L de solución de trabajo R3. Incube durante una hora a una temperatura de 20 a 25 °C en cámara húmeda. Homogeneice adecuadamente.

2.-Adición de los Calibradores, el Control y las muestras a las tiras de reacción.

Transfiera 10 μ L de los Calibradores, el Control y las muestras a las tiras de reacción, según el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	E	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	A	E	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	B	F	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	B	F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	C	CB	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	C	CB	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	D	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	D	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Se muestran las concentraciones aproximadas que deben tener los calibradores del ensayo, en cada lote se determinan las concentraciones de los mismos.

Calibrador A 0 nmol de T4/L de suero

Calibrador B: 17 - 25 nmol de T4/L de suero

Calibrador C: 40 - 54 nmol de T4/L de suero
Calibrador D: 72 - 98 nmol de T4/L de suero
Calibrador E: 144 - 196 nmol de T4/L de suero
Calibrador F: 289 - 391 nmol de T4/L de suero
Control CB Control del ensayo

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA T4 NEONATAL para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.-Incubación de los Calibradores, el Control y las muestras.

Incube las tiras de reacción durante 2 horas a una temperatura de 20 a 25 °C en cámara húmeda.

4.-Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción 6 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.-Adición del Sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

6.-Incubación del Sustrato.

Incube en cámara húmeda a una temperatura de 20 a 25 °C. Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 150 unidades para el Calibrador A, sin embargo, debido a las variaciones de temperatura puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

7.-Lectura.

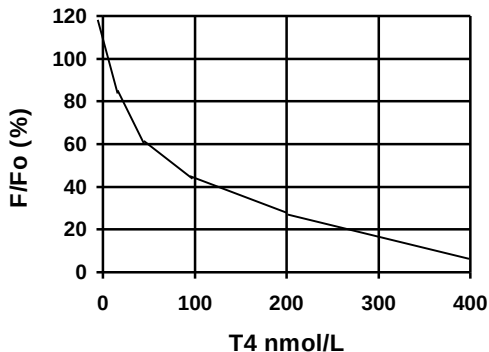
Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Se determina el cociente (Porcentaje de Fluorescencia con respecto al Calibrador A) entre la fluorescencia promedio (F) de los Calibradores, el Control y las muestras, y la fluorescencia promedio del calibrador A (Fo) y el resultado se expresa en por ciento. En el caso del Calibrador A: $F/F_o (\%) = 100$.

Los valores calculados de las muestras se interpolan en un gráfico de $F/F_o (\%)$ contra la concentración de T4 correspondiente a la curva de calibración, obteniéndose los valores de concentración en nmol de T4/L de suero.

Curva de Calibración



La validación, interpretación e impresión de los resultados son realizados automáticamente por el programa UMELISA T4 NEONATAL.

CONTROL DE LA CALIDAD

I. La curva de calibración debe cumplir la siguiente condición:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada calibrador deben proporcionar un decremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculado para el Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III. Rechaza los resultados de una muestra si los duplicados de la misma son discordantes.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En un estudio realizado a 410 neonatos con un estado eutiroideo bien definido, se determinó la concentración de T4 a partir de sangre del talón colectada en papel de filtro al quinto día de su nacimiento, empleando el estuche de reactivos URELISA T4 NEONATAL. Utilizando el 10^{mo} percentil de la distribución, el nivel de corte correspondió con 100 nmol de T4/L de suero, considerándose como bajos aquellos que sean inferiores a este valor.

Teniendo en cuenta los diversos factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Factores de Conversión mas usados:

nmol/L x 0,078 = µg/dL µg/dL x 12,87 = nmol/L

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

I. PRECISION.

Se calculó evaluando tres muestras comprendidas en tres rangos de valores; alto, medio y bajo.

PRECISION DEL URELISA T4 NEONATAL

(nmol/L)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=20)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
37,48	3,8	10,14	4,6	12,39
56,22	4,7	8,39	6,1	10,86
86,55	5,4	6,89	6,2	7,22

D.E: Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación

II. EXACTITUD.

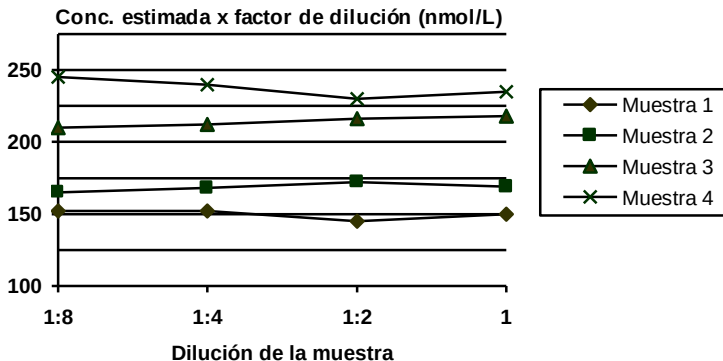
El porcentaje de recuperación obtenido al evaluar seis controladores del CDC fue mayor del 90 %.

Recuperación del URELISA T4 NEONATAL

CDC (Código)	Valor Esperado (nmol/L)	Valor Obtenido (nmol/L)	Recuperación (%)
2312	109,4	109,8	100,4
2313	61,8	68,6	111
2314	65,6	71,1	108,4
3311	102,96	98,1	95,2
3312	57,9	66,7	115,1
3313	131,3	120,5	91,8

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de sangre con altas concentraciones de T4 antes de que fueran colectadas sobre papel de filtro. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue de $\pm 10\%$ de la concentración original en la muestra pura.

Paralelismo del UMELISA T4 NEONATAL



III. DETECTABILIDAD.

La concentración mínima detectable fue de 17 nmol de T4/L de suero. Se definió como la concentración calculada para una fluorescencia equivalente al Calibrador A - 2 D.E.

IV. ESPECIFICIDAD.

El estudio de especificidad se realizó evaluando la reactividad cruzada con otras sustancias relacionadas estructuralmente, en las condiciones normales del ensayo.

(L) - T4	100 %
(D) - T4	26 %
(L) - T3	1,5 %
(D) - T3	1,9 %
(L) - T2	< 0,08 %
Acido Tri-iodopropiónico	2,9 %

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Evered, D.C.: Diseases of the thyroid gland. Clinics in Endocrinology and Metabolism. 3: 1979.
- 2.-Dussault, J.H. et al.: Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. J. Pediatric. 86:670, 1975.
- 3.-Dussault, J.U., Walker, P.: En Congenital Hypothyroidism. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, 1983.
- 4.-Raiti, S., Newns, G.A.: Cretinism: early diagnosis and its relation to mental prognosis. Arch. Dis. Child. 46:692, 1971.
- 5.-Klein, A.H., Meltzer, S., Kenny, F.M.J.: Improved diagnosis of congenital hypothyroidism treated before age 3 months. J. Pediatric. 81:912, 1972.
- 6.-Hearn, T.L., Hannon, W.H.: Interlaboratory surveys of the quantitation of thyroxine and thyrotropine in dried blood spot specimens. Clin. Chem. 10:2022, 1982.
- 7.-González, R.R., Robaina, R., Rodríguez, M.E., Blanca, S.: An enzyme ultramicroanalytical system. Clinical Chemistry Acta. 197:59, 1991.
- 8.-Elves, L.H., Loeber, J.G. The need for standardized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. Early Human Development 45: 179-190, 1996.

Edición No. 2
Julio 11, 2007.

UMELISA T4 NEONATAL

Código UM 2125 (para la utilización de ponches de 3 mm)

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25. Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.

Teléfono: 208-2929, Fax (537) 208-6514.