

---

---

## INTERÉS CLÍNICO

El UMELISA TSH NEONATAL ha sido concebido para el pesquisaje de Hipotiroidismo Congénito en recién nacidos. Esta enfermedad, causada por la ausencia anatómica o funcional de la glándula Tiroides, constituye la causa más frecuente de retraso mental evitable, con una frecuencia aproximada a nivel mundial de 1:4 000 recién nacidos (1).

El desarrollo del Hipotiroidismo Congénito puede evitarse sólo si el tratamiento substitutivo comienza en los primeros momentos de la vida, por lo cual el diagnóstico precoz constituye la clave para el tratamiento exitoso de la enfermedad.

En 1974, se desarrolló el primer programa de pesquisaje en recién nacidos en busca de Hipotiroidismo Congénito (2), basándose en la determinación de Tiroxina (T4). Teniendo en cuenta que el déficit de hormonas tiroideas condiciona un aumento en la secreción de la Hormona Estimulante del Tiroides (TSH) en sangre, se desarrolló un programa con objetivos similares, pero basado en la determinación de esta última hormona (3). Trabajos posteriores favorecen la utilización de la determinación de TSH sobre la determinación de T4 en el diagnóstico precoz de Hipotiroidismo Congénito (4,5). Esta determinación posibilita además la confirmación del diagnóstico de Hipotiroidismo Primario y elimina los resultados falsos positivos del pesquisaje cuando se utiliza T4 como primera determinación.

## FUNDAMENTO DEL ENSAYO

La Hormona Estimulante del Tiroides (TSH) es una hormona glicoproteica con un peso molecular de 28 000 D. Está compuesta de dos cadenas polipeptídicas que se han denominado Alfa y Beta. La cadena Alfa muestra una gran similitud con las de las otras hormonas de estructura similar (FSH, HCG, LH) mientras que la cadena Beta confiere a la hormona su especificidad inmunológica y funcional.

El UMELISA TSH NEONATAL es un ensayo heterogéneo inmunoenzimático tipo sandwich, en el cual se utiliza como fase sólida, placas de tiras con pocillos revestidos previamente con anticuerpos monoclonales Anti cadena Beta de la TSH, lo cual garantiza la especificidad del ensayo.

Las muestras, los calibradores y el control en manchas de sangre seca se eluyen con un conjugado Anti TSH Humana (Carnero)/Fosfatasa Alcalina (F.A.). Este eluato se deposita en los pocillos de las tiras, permitiendo la formación del complejo anticuerpo/TSH/anticuerpo-enzima. La realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados. Al añadir un sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato) en los pocillos de las tiras, éste resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de TSH presente en la muestra.

**El UMELISA TSH NEONATAL** es un ensayo diseñado para ser utilizado con el Sistema Ultramicroanalítico (**SUMA**), adecuado para efectuar la prueba en óptimas condiciones y garantizando el empleo del equipamiento necesario.

---



---

## CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO Código UM 2127 (576 pruebas) y Código UM 2227 /288 pruebas)

<b>Contenido:</b>	<b>UM 2127</b>	<b>UM 2227</b>
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	6	3
Tarjeta con calibradores y control en sangre seca	2 x 3 curvas	2 x 3 curvas
R1: Solución Tampón	1 x 25 mL	1 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 18 mL	1 x 18 mL
R3: Conjugado	2 x 2 mL	1 x 2 mL
R4: Sustrato	1 x 2 mL	1 x 2 mL
R5: Tampón Sustrato	1 x 18 mL	1 x 18 MI

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros 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 con un valor de hematocrito del 55 % y calibrados frente al patrón internacional IRP 81 565 de la O.M.S.

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

Los calibradores y el control, fueron negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg y Anti-VHC, 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 solución R1 hasta un volumen de 50 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma.

**R2:** Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 4 mL (1 mL de R2 + 3 mL de R1).

**R3:** Diluya 1:21 con solución de trabajo R2. Cantidad necesaria para 4 tiras de reacción: 4 mL (0,2 mL de R3 + 4 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 estas 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 2 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución del ensayo.

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

---

---

### MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10  $\mu$ L.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000  $\mu$ L.
- Probetas graduadas entre 10 y 250  $\mu$ L.
- Incubadora a 37  $\pm$  1  $^{\circ}$ C.
- Papel absorbente.
- Placas o tubos para realizar la elución.

### PRECAUCIONES

- 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. Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro **S&S 903** no deben permanecer a temperatura ambiente por más de una semana. Almacenadas entre 2 y 8  $^{\circ}$ C son estables durante 4 meses (8).
- Deben colectarse las muestras en papel de filtro **S&S 903**.
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarlas la cubierta protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.
- 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 5 ciclos con solución de trabajo R1 y un lavado de 5 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 TSH 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. Dépositelo en un recipiente adecuado para realizar la elución (placa de microtitulación o similar) y añádale 70 µL de la solución de trabajo R3. Agite las muestras, Calibradores y Control durante 5 minutos. Para este procedimiento se puede utilizar un agitador de placas, un lavador MW 2001, o una pipeta multicanal homogenizando suavemente el volumen de eluato en cada pocillo. Incube durante 60 minutos a una temperatura entre 20 y 25 °C en cámara húmeda. Antes de realizar la transferencia a las tiras de reacción agite las muestras, Calibradores y Control nuevamente durante 5 minutos como se indica anteriormente.

### 2.- Adición de los calibradores, el control y las muestras a las tiras de reacción.

Transfiera 10 µL de los calibradores, el control y las muestras a las tiras de reacción. Para los lectores SUMA se seguirá 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

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

Calibrador A: 0 mUI/L de sangre total

Calibrador B: 8-12 mUI/L de sangre total

Calibrador C: 21-29 mUI/L de sangre total

Calibrador D: 42-58 mUI/L de sangre total

Calibrador E: 85-115 mUI/L de sangre total

Calibrador F: 135-165 mUI/L de sangre total

Control CB: Control del ensayo.

---

**Se recomienda evaluar las muestras por duplicado.** Si utiliza el programa UMELISA TSH 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.**

Incuba las tiras de reacción 2 horas a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

**4.- Lavado.**

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo. 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.**

Incuba en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 150 unidades para el Calibrador F, 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.

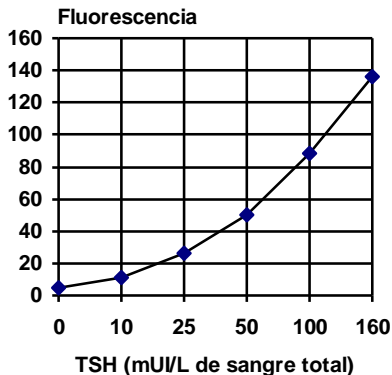
**7.- Lectura.**

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

## PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

-Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra el logaritmo de la concentración de TSH correspondiente a la curva de calibración, obteniéndose los valores de concentración en mUI/L de sangre total. Entre el Calibrador A y el Calibrador B se utiliza una escala lineal-lineal. Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.

## Curva de Calibración



-La validación, interpretación e impresión de los resultados son realizados automáticamente por el programa UMELISA TSH NEONATAL. Si no dispone del mismo los resultados obtenidos se determinan comparando los valores de concentración de TSH calculada con el valor de referencia.

### CONTROL DE LA CALIDAD

I. La curva de calibración debe cumplir las siguientes condiciones:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada calibrador (A-F) deben proporcionar un incremento 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

Teniendo en cuenta los diferentes 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.

Generalmente se acepta como valor límite 25 mUI/L en sangre del cordón y 15 mUI/L en sangre del talón colectadas en neonatos entre el tercer y séptimo día de nacidos. Las muestras que presentan una concentración igual o superior son consideradas como elevadas.

Factor de Conversión:

mUI/L de sangre total x 2,2 = mUI/L de suero

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

### 1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras de concentraciones conocidas de TSH en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

#### Precisión del UMELisa TSH NEONATAL

TSH (mUI/L de sangre total)	Intraensayo (n=15)		Interensayo (n=10)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
25,21	1,73	6,87	1,96	7,76
53,14	3,62	6,81	3,92	7,38
108,50	7,31	6,74	5,79	5,61

DE: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de Variación

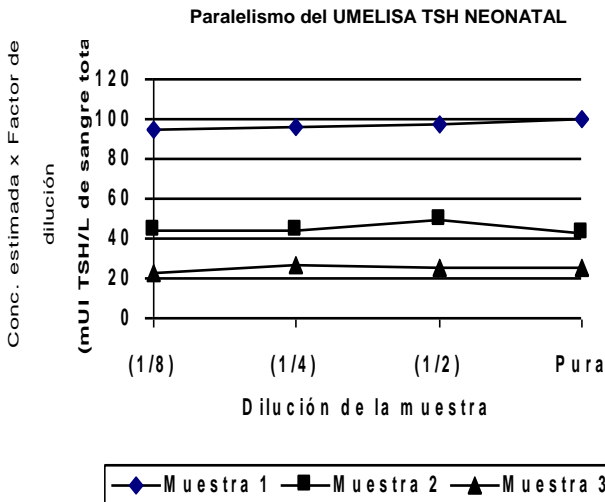
### 2. EXACTITUD.

El porcentaje de recuperación obtenido al añadir diferentes cantidades de TSH (Patrón Internacional de Referencia 80558) a tres muestras de sangre de concentración conocida antes de ser colectadas en papel de filtro promedió un 105,2 ± 9,3 %.

#### Recuperación del UMELisa TSH NEONATAL

Muestras	Valor Esperado (mUI/L de sangre total)	Valor Obtenido (mUI/L de sangre total)	Recuperación (%)
1	15	14,6	97,0
2	30	34,6	115,3
3	60	61,9	103,2

Se realizaron diluciones seriadas a tres muestras de sangre con altos niveles de TSH antes de que fueran colectadas en papel de filtro, mostrándose paralelas a la curva de calibración. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue de  $\pm 3,2$  % de la concentración original en la muestra pura.



### 3. DETECTABILIDAD.

La concentración mínima detectable fue de 1,3 mUI/L de sangre total. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Calibrador A + 2 DE, utilizando como referencia el patrón internacional IRP 80 558 de la OMS.

### 4. ESPECIFICIDAD.

Se evaluó la reactividad cruzada con otras hormonas glicoproteicas.

FSH (-)

LH (-)

HCG (-)

No se ha evidenciado interferencia en el ensayo con otras proteínas séricas.



---

## 5. EFECTO HOOK.

No se mostró evidencia de efecto Hook a concentraciones de TSH de 100 UI/L.

### BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Dussault, J.H.; Walker, P.: In Congenital Hypothyroidism. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, 1983.
- 2.-Dussault, J.H. et al.: Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. J Pediat 86:670, 1975.
- 3.-Irie, M.; Enomoto, K.; Naruse, H.: Measurement of thyroid stimulating hormone in dried blood spot. Lancet 2: 1233, 1975.
- 4.-Naruse, H. et al: The result of parallel assay of TSH and T4 in the same sample. In Naruse H.; Irie, M. (Eds): "Neonatal Screening". Amsterdam: Excerpta Medica. pag. 69, 1983.
- 5.-Fukusi, M. et al.: Screening survey for congenital hypothyroidism by measuring of TSH and T4. En Naruse, H.; Irie, M. (Eds): "Neonatal Screening". Amsterdam. Excerpta Medica, pag. 71, 1983.
- 6.-Naruse, H.; Irie, M.: Neonatal Screening International Congress. Serie 606. Amsterdam. Excerpta Medica. 1983.
- 7.-Delange, F.; Members of the Newborn Committee of the European Thyroid Association: Neonatal Screening for Congenital Hypo-thyroidism in Europe. Acta Endocrinol 90 (Suppl) 223, 1979.
- 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.

**Febrero 14, 2006**

#### **UMELISA TSH NEONATAL**

**Códigos UM 2127 y UM 2227 (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.**