

<p>República de Colombia</p>  <p>Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	1 de 17

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA REALIZACION DE TSH NEONATAL TECNICA DE ELISA ACCU BIND

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	2 de 17

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO	4
2. ALCANCE	4
3. NORMATIVIDAD APLICABLE	4
4. RESPONSABILIDADES	4
5. DEFINICIONES Y/O ABREVIATURAS	4
6. CONDICIONES GENERALES	5
7. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO	7
7.1 TSH NEONATAL.....	7
7.2 ENSAYO INMUNOENZIMOMETRICO TIPO 4	9
8. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.....	10
9. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA.....	10
10. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	10
11. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA	10
11.1 MATERIALES NO SUMINISTRADOS POR EL KIT.....	10
11.2 EQUIPOS MONTAJE SEMIAUTOMATIZADO.....	11
11.3 EQUIPOS MONTAJE MANUAL.....	11
11.4 REACTIVOS	11
11.4.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	11
11.5 CONTROLES.....	11
11.6 MATERIALES DE REFERENCIA	12
12. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO	12
12.1 MONTAJE EQUIPO DE DSX.....	12
12.2 MONTAJE MANUAL	13
13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO	15
14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	15
14.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DE TSH NEONATAL.....	15
14.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	16

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	3 de 17

15. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	16
16. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS.....	16
17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	16
18. CONTROL DE CAMBIOS	17
19. ANEXOS	17

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	4 de 17

1. OBJETIVO

Establecer los lineamientos generales para medir la concentración de Hormona Estimulante de la Tiroides en muestras de sangre seca en papel filtro de Talón y cordón, mediante la prueba ELISA ACCU BIND N-TSH.

2. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para el procesamiento de muestras de sangre seca que lleguen al laboratorio para TSH NEONATAL que se procesan por ELISA.

3. NORMATIVIDAD APLICABLE

- NTC ISO/IEC 17025:2017

4. RESPONSABILIDADES

Coordinador Del Laboratorio Departamental De Salud Pública: se encargará de revisar y aprobar el actual documento, teniendo en cuenta que se cumplan con las normas establecidas, y de esta manera avalar los resultados emitidos por el laboratorio.

Profesional Responsable De La Sección de inmunoserología Del Laboratorio Departamental De Salud Pública: se encargará de aplicar los lineamientos descritos en el documento con estándares de calidad, oportunidad y avalará los resultados que se procesen mediante este ensayo.

Será responsabilidad del profesional del Laboratorio de Inmunoserología aplicar lo descrito con calidad y oportunidad, así como, garantizar los resultados que se generan del mismo.

El personal del área deberá dar cumplimiento a lo consignado en el MANUAL DE ROLES Y RESPONSABILIDADES DEL PERSONAL DEL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA MI-GS-MA-30

5. DEFINICIONES Y/O ABREVIATURAS

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	5 de 17

6. CONDICIONES GENERALES

Los equipos utilizados en el procesamiento de muestras de TSH NEONATAL requieren de las siguientes condiciones ambientales:

DSX

Temperatura: 15 a 30°C

Humedad relativa: 15% a 85%

LAVADOR AUTOMATIZADO

Temperatura: 10 a 40°C

Humedad relativa: 10% a 80%

LECTOR DE ELISA

Temperatura: 10 a 40°C

Humedad relativa: 10% a 80%

El Laboratorio realiza monitoreo de Temperatura y Humedad Relativa y se registran en el formato CONTROL TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA MI-GS-RG-37. Durante el montaje de la prueba ELISA ACCU BIND N-TSH se requiere que la temperatura del área de procesamiento se encuentre entre 20°C y 27°C:

El personal encargado del proceso debe estar entrenado en las técnicas de diagnóstico virológico, conocer los factores de riesgos biológicos y las condiciones de bioseguridad tipo 1 en el manejo, conservación y descarte de material biológico.

Aplicar normas de Bioseguridad durante el procesamiento de muestras y utilizar los elementos de protección personal que incluye: bata, guantes, caretas y protección ocular, tal y como se contempla en la LISTA DE CHEQUEO DE BIOSEGURIDAD, MANEJO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS MI-GS-RG-713

Las muestras deben manejarse con las debidas precauciones como material potencialmente infectocontagioso.

Dado que ni la inactivación ni el método de test pueden excluir con total seguridad el riesgo de infección, se recomienda tratar este tipo de material con el mismo cuidado que una muestra de paciente.

Precauciones y recomendaciones de bioseguridad para el profesional

- Lea siempre las instrucciones del inserto antes de abrir un estuche nuevo.
- Evite la contaminación microbiana, trabajando con todos los cuidados exigidos bajo las condiciones de bioseguridad tipo 1.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	6 de 17

- Ningún reactivo o elemento que este derramado, dañado, averiado y vencido deberá ser utilizado.
- Si ocurre cualquier contacto con la piel, lave con abundante agua.

Precauciones en el análisis:

- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede afectar a su rendimiento y producir resultados erróneos.
- No modifique el procedimiento del ensayo ni utilice reactivos de otros fabricantes ni de otros lotes, a menos que se indique que el reactivo pueda utilizarse indistintamente. No reduzca el tiempo de incubación recomendado.
- Antes del uso, deje que los reactivos y las muestras alcancen una temperatura entre 20°C y 27°C. Después del uso, vuelva a almacenarlos bajo las condiciones antes indicadas.
- Para almacenar los reactivos y las muestras no utilice refrigeradores que se descongelen automáticamente.
- No exponga los reactivos a la luz intensa ni a vapores de hipoclorito durante el almacenamiento o la incubación.
- Evite que los pocillos se sequen durante el ensayo. No cause contaminación cruzada en los reactivos.
- Utilice siempre la misma pipeta para la solución de sustrato de los ensayos. Asimismo, deberá utilizar siempre la misma pipeta para el conjugado.
- No toque ni salpique el borde de los pocillos con el conjugado. No pipetee expulsando aire hacia afuera. Se recomienda, siempre que sea posible, el pipeteo con la técnica inversa.
- Asegúrese de que el fondo de la placa esté limpio y seco y de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de la lectura de la placa.
- Evite contaminar los micro pocillos con el talco de los guantes desechables. Si utiliza procesadores de micro placas automáticos:

i) No es necesario tapar las placas ni secarlas golpeándolas.

ii) No permita que los líquidos del sistema contaminen las muestras o los reactivos.

iii) Se debe excluir la posibilidad de contaminación cruzada entre ensayos cuando valide ensayos en procesadores completamente automáticos.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	7 de 17

7. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO

7.1 TSH NEONATAL

La determinación de TSH es el parámetro más sensible para el diagnóstico del hipotiroidismo. Su elevación es indicativa de que la función del tiroides es insuficiente. Este fenómeno se produce antes de que comiencen a descender en la sangre las concentraciones de hormonas tiroideas. Generalmente, en el hipotiroidismo establecido, además de la elevación de TSH, se produce un descenso de T4. El nivel de T3 con frecuencia se encuentra dentro de la normalidad. Puede acompañarse de una determinación de T4 y de anticuerpos anti tiroideos si se desea conocer si la causa se debe a fenómenos de autoinmunidad.

La causa más frecuente de hipotiroidismo es la tiroiditis de Hashimoto que da lugar a una destrucción progresiva del tiroides como consecuencia de fenómenos de autoinmunidad. Es como si el organismo no reconociera al tiroides como propio, por lo que procede a su destrucción por medio de anticuerpos que produce el sistema inmune. Es más frecuente en mujeres a partir de los 40 años, aunque puede darse en otras edades y en varones.

La cirugía del tiroides por nódulos, hipertiroidismo o por carcinoma de tiroides puede ser, igualmente, causa de hipotiroidismo. En estos casos no existe mecanismo autoinmune, sino que la extirpación del tejido glandular conduce a una secreción insuficiente de hormonas tiroideas a la sangre.

El yodo radioactivo como tratamiento del hipertiroidismo o del cáncer de tiroides es igualmente causante de hipotiroidismo.

Es menos frecuente el hipotiroidismo causado por defectos enzimáticos, con frecuencia de carácter hereditario, que comprometen la síntesis de hormonas tiroideas. Los defectos enzimáticos pueden cursar con aumento del tamaño de la glándula (bocio). Los defectos del desarrollo de la glándula pueden producir hipotiroidismo congénito que es preciso detectar en el recién nacido.

La toma de medicamentos anti tiroideos como carbimazol, metimazol o propiltiouracilo, de fármacos muy ricos en yodo (como el antiarrítmico amiodarona, jarabes antitusígenos y expectorantes) puede paralizar la síntesis de hormonas tiroideas y/o generar anticuerpos anti tiroideos provocando hipotiroidismo.

El tratamiento con litio, empleado en la psicosis maníaco-depresiva bloquea la salida de hormonas del tiroides y también es causa de hipotiroidismo.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	8 de 17

Son más raros los hipotiroidismos secundarios, producidos por falta de secreción de TSH por la hipófisis. En estos casos la glándula tiroides está intacta, pero falta su hormona estimuladora, lo que hace que no funcione, disminuyendo las hormonas tiroideas en la sangre. En estos casos nunca aparece bocio. Al igual que el resto de enfermedades del tiroides, el hipotiroidismo es más frecuente en el sexo femenino. Afecta al 2% de las mujeres adultas y al 0,1-0,2% de los hombres. Es a partir de los 40-50 años cuando las mujeres tienden a desarrollar con más frecuencia hipotiroidismo de causa autoinmune (tiroiditis de Hashimoto). El periodo postparto es igualmente propenso a la aparición de este problema.

Los recién nacidos de madres hipertiroideas, hayan recibido o no tratamiento anti tiroideo durante la gestación, deben ser evaluados en este sentido.

Las personas en las que se detectan anticuerpos anti tiroideos (antimicrosomales, antitiroglobulina) tienden a desarrollar con el tiempo alteraciones de la función tiroidea, por lo que deben ser evaluados crónicamente de forma periódica.

El diagnóstico se realiza por la Determinación cuantitativa de la Concentración de Tirotropina en sangre seca en papel filtro, su procesamiento por técnica cuantitativa ELISA, la fase solida es revestida con anticuerpos monoclonales anti-cadena B de la TSH; SE agrega muestra sangre seca para la elución hay formación de anticuerpos/TSH/anticuerpo enzima, después el lavado de componentes no fijados, y la adición de sustrato dando una reacción proporcional a la concentración de TSH en la muestra.

Las muestras a procesar deben ser seleccionadas si cumplen los criterios de control de calidad según protocolo TSH neonatal descrito en la siguiente imagen.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	9 de 17

Figura 1. Criterios de control de calidad de muestras de TSH NEONATAL



7.2 ENSAYO INMUNOENZIMOMETRICO TIPO 4

Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo secuencial inmunoenzimométrico deben incluir anticuerpos con una alta afinidad y especificidad (conjugado enzimático e inmovilizado), con diferente reconocimiento de epítopes, en exceso, así como antígenos nativos.

En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina cubierta en el pozo y los anticuerpos monoclonales biotinilados anti-TSH que fueron adicionados exógenamente.

Después de la mezcla del búfer de elución con anticuerpos biotinilados, con la mancha de sangre seca que contiene el antígeno nativo, los resultados de la reacción entre el antígeno eluido el anticuerpo forman un complejo antígeno – anticuerpo.

Después de un periodo de incubación adecuado, la unión antígeno – anticuerpo unido a la fracción unida es separada por decantación o aspiración. Otros anticuerpos (dirigidos a diferentes epítopes) etiquetados con una enzima es

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	10 de 17

adicionado. Otra interacción ocurre para formar un complejo anticuerpo biotinilado – antígeno – anticuerpo marcado enzimáticamente en la superficie de los pozos.

La enzima en exceso es retirada por medio de un paso de lavado. Un sustrato adecuado es adicionado para producir un color medible con el uso de espectrofotómetro. La actividad de la enzima en el pozo es directamente proporcional a la concentración de TSH en la mancha de sangre seca. Utilizando diferentes gotas secas con concentraciones de antígenos conocidas, una curva de dosis respuesta se genera y desde esta se pueden obtener la concentración de antígenos de muestras desconocidas.

8. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.

No se documentan limitaciones o interferencias

9. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Para este ensayo se reciben muestras de los laboratorios de la red, de neonatos tomadas de talón o cordón umbilical, impregnadas en una tarjeta de papel filtro S&S (TIPO n.903) llenando el círculo marcado.

El papel filtro se debe dejar secar a temperatura ambiente durante 12 horas, evitando el calor y la humedad. Almacenar la muestra de sangre seca en papel filtro dentro de una Bolsa metalizada con desecante.

Las muestras serán identificadas con un código consecutivo asignado en la recepción de muestras clínicas y quedará registrado en la base de datos del evento TSH NEONATAL. Procedimiento TRAZABILIDAD DE MUESTRAS RECEPCIONADAS PARA DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA Y/O CONTROL DE CALIDAD MI-GS-PR-100

10. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre seca en papel filtro son estables entre 2°C a 8°C durante 3 semanas.

11. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

11.1 MATERIALES NO SUMINISTRADOS POR EL KIT

- Perforadora de papel de 1/8" para dispensar muestras de sangre seca
- Guantes sin polvo
- Cronómetro

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	11 de 17

- Agitador de laboratorio ajustable a rotación.
- Micropipetas
- Lavador de microplaca o botella de lavado
- Lector de microplaca
- Papel absorbente
- Cubierta plástica de microplaca

11.2 EQUIPOS MONTAJE SEMIAUTOMATIZADO

- Equipo DSX para ELISA automatizado

11.3 EQUIPOS MONTAJE MANUAL

- Lavador automático Thermo científico
- Lector de absorbancia Thermo científico
- Termo shaker
- Pipetas de precisión entre 100 y 500 uL.
- Probetas graduadas entre 250 y 500 ml.

11.4 REACTIVOS

- Reactivo NTSH BIOTINA: Listo para usar
- Reactivo enzimático NTSH: Listo para usar
- Placa revestida con Estreptavidina (96 pozos) : Listo para usar
- Solución concentrada de lavado: Preparar solución de trabajo
- Solución Sustrato A: Listo para usar
- Solución de parada de reacción (1N H₂SO₄) : Listo para usar

11.4.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Solución concentrada de lavado: Diluir 1:50 partes con agua desionizada (Ejemplo: Para un vial de 20 ml diluir en 1 litro, para un vial de 60 ml diluir en 3 litros). Almacenar a temperatura de 2°C a 30°C hasta por 60 días.

11.5 CONTROLES

Se utilizarán los controles incluidos en cada kit.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	12 de 17

Para el ensayo de TSH NEONATAL se utilizarán 3 niveles de controles de sangre total con diferentes concentraciones del antígeno TSH colocadas en papel filtro S&S tipo 903, incluidos en el kit, cuyos valores exactos están impresos en el exterior de las bolsas de aluminio de cada kit y se debe dividir este dato en 1.8.

11.6 MATERIALES DE REFERENCIA

Los calibradores utilizados se encuentran incluidos dentro de cada kit de reactivo.

Después de usar, volver a guardar los calibradores a 2°C a 8°C o desecharlos en bolsa roja al momento de terminado el kit.

Para el ensayo de TSH NEONATAL se utilizarán 6 niveles de concentración de TSH en gotas de sangre seca en concentraciones aproximadas de 0(A), 7 (B), 18 (C), 45 (D), 110 (E) y 250 (F) uIU/ml, los cuales deben ser almacenados de 2 °C a 8 °C.

Los valores exactos están impresos en el exterior de las bolsas de aluminio de cada kit y se debe dividir este dato en 1.8.

12. DESCRIPCION GENERAL DEL PROCEDIMIENTO

Antes de proceder con el análisis llevar los reactivos y muestras a temperatura ambiente (20°C a 27°C).

1. Verificar en la BASE DE DATOS DE TSH NEONATAL las muestras a procesar
2. Diligenciar el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
3. Perfore un punto de sangre de cada calibrador, control y muestras dentro de los pozos asignados en la placa de reacción. Las muestras de calibrador y controles se deben ensayar por duplicado. Tener precaución de usar guantes sin polvo y ponchar en flor, sin tocar bordes.

12.1 MONTAJE EQUIPO DE DSX

1. Realizar el encendido y mantenimiento del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
2. Realice el ingreso de las muestras y la selección de la prueba TSH NEONATAL FASE 1 MONOBIND siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	13 de 17

3. De inicio al procesamiento de las muestras siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
4. A continuación, el equipo inicia el procesamiento de las muestras realizando los siguientes pasos:
 - El equipo agrega 100ul de Reactivo NTSH Biotina dentro de cada pozo
 - El equipo lleva la placa a incubación y en agitación a una velocidad de 800 +/- 100 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente 20°C a 27°C.
 - Una vez finalizado el tiempo de incubación, el equipo termina la corrida.
 - Sacar la placa y descartar los contenidos de la misma por decantación
5. Golpee y seque la placa con papel absorbente. Asegúrese que todos los puntos de papel filtro sean removidos. **NO** deben quedar puntos dentro de los pozos.
6. Realice el ingreso de las muestras y la selección de la prueba TSH NEONATAL FASE 2 MONOBIND siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
7. De inicio al procesamiento de las muestras siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
8. A continuación, el equipo inicia el procesamiento de las muestras realizando los siguientes pasos:
 - El equipo realiza el lavado: agrega 350 ul de solución de lavado, decantar y secar. (Se realiza el procedimiento de lavado 5 veces).
 - El equipo agrega 100 ul de Reactivo enzimático NTSH a cada pozo.
 - El equipo lleva la placa a incubación y en agitación a una velocidad de 800 +/- 100 rpm durante 45 minutos a temperatura ambiente.
 - El equipo realiza el lavado: agrega 350 ul de solución de lavado, decantar y secar. (Se realiza el procedimiento de lavado 5 veces).
 - El equipo agrega 100 ul de Solución sustrato a cada pozo
 - El equipo lleva la placa a incubación y en agitación a una velocidad de 800 +/- 100 rpm durante 45 minutos a temperatura ambiente.
 - El equipo agrega 50 ul de Solución de parada a cada pozo y mezclar fuertemente durante 15 a 20 segundos.
9. El equipo lleva la microplaca a la estación de lectura y emite el resultado de las absorbancias y concentración de acuerdo a la curva de calibración de la misma.
10. Registrar los resultados en el Formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
11. Realizar el mantenimiento y apagado del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.

12.2 MONTAJE MANUAL

1. Agregue 100ul de Reactivo NTSH Biotina dentro de cada pozo

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SALUD Gobernación de Santander</p>	<p>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND</p> <p>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	14 de 17

2. Agitar la microplaca suavemente durante 20-30 segundos (Asegúrese que todos los puntos de sangre están completamente sumergidos en el líquido y no queden atascados en las paredes de los pozos).
3. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 90 minutos a temperatura ambiente usando agitador para microplacas a una velocidad de 800 +/- 100 rpm.
4. Descartar los contenidos de la microplaca por decantación. Golpee y seque la placa con papel absorbente. Asegúrese que todos los puntos de papel filtro sean removidos. **NO** deben quedar puntos dentro de los pozos.
5. Agregue 350 ul de solución de lavado, decantar y secar. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados.
6. Agregue 100 ul de Reactivo enzimático NTSH a cada pozo.
7. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 45 minutos a temperatura ambiente usando agitador para microplacas a una velocidad de 800 +/- 100 rpm.
8. Repetir el paso 5
9. Agregue 100 ul de Solución sustrato a cada pozo
10. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 45 minutos a temperatura ambiente usando agitador para microplacas a una velocidad de 800 +/- 100 rpm.
11. Agregue 50 ul de Solución de parada a cada pozo y mezclar fuertemente durante 15 a 20 segundos.
12. Realizar el encendido y mantenimiento del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27
13. Leer la absorbancia a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-630nm) siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27
14. Registrar la absorbancia obtenida a partir de la impresión del lector de microplaca en el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644 y CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL.
15. Una vez graficada la curva se obtienen los valores de “y”, los cuales se transcriben en el cuadro cálculo de la ecuación del formato CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL, el resultado de esta ecuación se utiliza para determinar la concentración de cada control y/o muestra de acuerdo a la absorbancia, el cual se calcula automáticamente en el cuadro CÁLCULO DE RESULTADOS DE MUESTRAS del formato CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL.
16. Registre los resultados de las concentraciones en el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
17. Realizar el mantenimiento y apagado del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	15 de 17

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

Los resultados de un ensayo se valida en el formato CARTA CONTROL INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-642 y serán válidos si los controles cumplen los siguientes criterios:

- Los controles: Las concentraciones de los controles deben estar dentro de los rangos establecidos para cada lote.
- Los calibradores: La absorbancia (DO) del calibrador F deber ser $\geq 1,2$.
- En el formato CARTA CONTROL INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-642 se realizará el seguimiento a los controles de cada kit y la validación de la prueba según indicaciones.
- Los ensayos que no cumplan estos criterios se deben repetir.
- Calibración periódica de equipos se incluyen los equipos de virología en el PLAN METROLÓGICO DE EQUIPOS E INSTRUMENTOS MI-GS-RG-160 del Laboratorio Departamental anualmente e intervenciones intermedias de ser necesario, evidenciado en las HOJA DE VIDA DE EQUIPOS MI-GS-RG-428

14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

14.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DE TSH NEONATAL

Se utiliza una curva de dosis respuesta para determinar la concentración de Tirotopina en muestras desconocidas.

A. Lectura en el equipo DSX

Cuando el procesamiento y lectura del montaje se realice en el equipo DSX, este realiza la gráfica de calibración y emite el reporte de los resultados con absorbancia y concentración.

B. Lectura en el equipo lector de ELISA

1. Registrar la absorbancia obtenida a partir de la impresión del lector de microplaca en el formato CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL.
2. El formato CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL, se encuentra parametrizado para graficar la curva de calibración de acuerdo a la concentración y absorbancia obtenida de cada patrón de referencia.
3. Una vez graficada la curva se obtienen los valores de “y”, los cuales se transcriben en el cuadro cálculo de la ecuación del formato CURVA DE

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	16 de 17

CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL, el resultado de esta ecuación se utiliza para determinar la concentración de cada control y/o muestra de acuerdo a la absorbancia, el cual se calcula automáticamente en el cuadro CÁLCULO DE RESULTADOS DE MUESTRAS del formato CURVA DE CALIBRACION PRUEBA ELISA TSH NEONATAL

14.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En Colombia se definió el punto de corte de la siguiente manera:

Muestra de cordón: $\geq 15\mu\text{UI/ml}$

Muestra de talón: $\geq 10\mu\text{UI/ml}$

Prematuro extremo (antes de la semana 28): Muestra de talón $\geq 6\mu\text{UI/ml}$ (se debe realizar la toma a las 72 horas de nacido).

Toda concentración que supere estos puntos de corte se interpretan como casos Probables.

15. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados de las concentraciones obtenidas y registradas en las hojas de trabajos se registrarán en la base de datos de TSH NEONATAL al igual que la fecha, hora y responsable del montaje de la prueba.

Los resultados de estas pruebas serán emitidos en el formato INFORME CONSOLIDADO CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-585 y deberán interpretarse de acuerdo al INSTRUCTIVO EVALUACION DEL DESEMPEÑO VIROLOGIA Y BANCOS DE SANGRE MI-GS-IN-15.

16. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

No aplica.

17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- INSERTO Accu Bind ELISA Microwells. Revision 5. Fecha: 043012
- Hopton M.R., & Harrap, J.J., "Immunoradiometric assay of thyrotropin as a "first line thyroid function test in the routine laboratory", *Clinical Chemistry* 32, 691 (1986)
- Caldwell, G. et. Al., "A new strategy for thyroid function testing", *Lancet*, I, 1117. (1985)
- Spencer, CA, et al., "Interlaboratory/Intermethod differences in Functional Sensitivity of Immunometric Assays of Thyrotropin (TSH) and Impact on Reliability of Measurement of Subnormal Concentrations of TSH", *Clinical*

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma

	MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TSH NEONATAL POR LA TÉCNICA DE ELISA ACCUBIND LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-110
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	17 de 17

Chemistry 41, 367. (1995)

- Beck-Peccoz, P., Persani, L.: "Variable biological activity of thyroid stimulating hormone." *Eur. J. Endocrinol* 131, 331-340. (1994)
- Bravermann, L.E.: "Evaluation of thyroid status in patients with thyrotoxicosis." *Clin. Chem.* 42, 174-181. (1996)
- Fisher, D.A: "Physiological variations in thyroid hormones. Physiological and pathophysiological considerations." *Clin. Chem.* 42, 135-139. (1996)
- Resolución 207 de febrero de 2024. Ministerio de Salud y protección social

18. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	14/08/2024	Emisión inicial del documento	ALBA ROCIO ORDUZ A Coordinador Grupo LSP ZULEMA GALVIS Directora de Salud Integral SAMUEL SANTAMARÍA Director de Planeación Y Mejoramiento en salud.	EDWIN ANTONIO PRADA RAMIREZ Secretario de Salud

19. ANEXOS

- INSTRUCTIVO DE MANEJO DE EQUIPO DSX MI-GS-IN-18
- INSTRUCTIVO DE MANEJO EQUIPO LECTOR DE ELISAS
- INSTRUCTIVO DE MANEJO EQUIPO LAVADOR DE ELISAS

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayte Gicela González	-	Jenny Osma