



TSH Elisa

KAPDB4080



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230629

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
200224/1	230629
One control provided	Two controls provided
Old Diasource logo	New DiaSource logo on the front page



TSH Elisa

en

For the direct quantitative determination of Thyroid Stimulating Hormone by enzyme immunoassay in human serum.

KAPDB4080

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Thyroid Stimulating Hormone by enzyme immunoassay in human serum.
For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows a typical one-step capture or 'sandwich' type assay. The assay makes use of two highly specific monoclonal antibodies: A monoclonal antibody specific for TSH is immobilized onto the microwell plate and another monoclonal antibody specific for a different region of TSH is conjugated to horse radish peroxidase (HRP). TSH from the sample and calibrators are allowed to bind simultaneously to the plate and to the HRP conjugate. The washing and decanting steps remove any unbound HRP conjugate. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed by the enzymatic reaction is directly proportional to the concentration of TSH in the sample.

A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of TSH in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Thyroid stimulating hormone (TSH) is a glycoprotein hormone secreted by the anterior pituitary gland. TSH has two subunits, namely α and β . The α subunit of TSH is similar to the α subunit found in the LH, FSH and hCG glycoprotein hormones. However, the β subunit is specific and differs from hormone to hormone.

The thyroid hormones are secreted and produced by the thyroid gland. The production of thyroid hormones is under the regulation of TSH. Also, TSH acts as a stimulator of iodide transport and the gland itself is under the positive control of TSH. The concentrations of thyroid hormones control the secretion of TSH, therefore, a negative feedback exists. It is to be noted that the secretion of thyroid hormones are under the direct, positive effect of the sympathetic nervous system. The major protein component of the thyroid gland is thyroglobulin, a glycoprotein of which the secretion in the blood stream is stimulated by TSH. Therefore, TSH plays an important role in the proper function and development of the thyroid gland.

It is recommended to assay both the glycoprotein hormone and the target organ hormones. For example, in primary hypothyroidism the serum level of thyroxine is low while the TSH level is high. In secondary hypothyroidism, both thyroxine and TSH are low. The TSH level is decreased in hyperthyroidism.

Today, with all the sensitive assays available, if there were to be only one test to be prescribed for thyroid function, TSH would be the test. TSH determinations are also helpful to monitor patients who receive thyroxine replacement therapy.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibrator curve must be established for every run.
7. The control should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.

11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of TSH in human serum. The kit is not calibrated for the determination of TSH in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only calibrator 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.
6. Some individuals may have antibodies to mouse protein that can possibly interfere in this assay. Therefore, the results from any patients who have received preparation of mouse antibodies for diagnosis or therapy should be interpreted with caution.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 μ l
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED



Mouse Anti-TSH Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells

- Ready To Use.
Contents: One 96 well (12x8) monoclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Ab	HRP	CONC
----	-----	------

Mouse Anti-TSH Antibody-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate - X50

Contents: Anti-TSH monoclonal antibody-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 300 µl/vial
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 mL of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12 mL of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL	N
-----	---

TSH Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5

Contents: Six vials containing TSH in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of TSH. 1µIU of the calibrator is equivalent to 1 µIU of the 2nd IIS 80/558.
*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 µIU/mL	2.0 mL
Calibrator 1	0.2 µIU/mL	0.5 mL
Calibrator 2	1 µIU/mL	0.5 mL
Calibrator 3	5 µIU/mL	0.5 mL
Calibrator 4	15 µIU/mL	0.5 mL
Calibrator 5	30 µIU/mL	0.5 mL

Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL

Controls - Ready To Use.

Contents: Two vials containing TSH in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of TSH. Refer to vial label for expected value and acceptable range.

Volume: 0.5 mL/vial
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Wash Buffer Concentrate - X10

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of water.

ASS	BUF
-----	-----

Assay Buffer - Ready To Use.

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 15 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

CHROM	TMB
-------	-----

TMB Substrate - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume: 16 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN
------	------

Stopping Solution - Ready To Use.

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
Volume: 6 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment:

None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solution of the anti-TSH-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 90 minutes at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator F attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

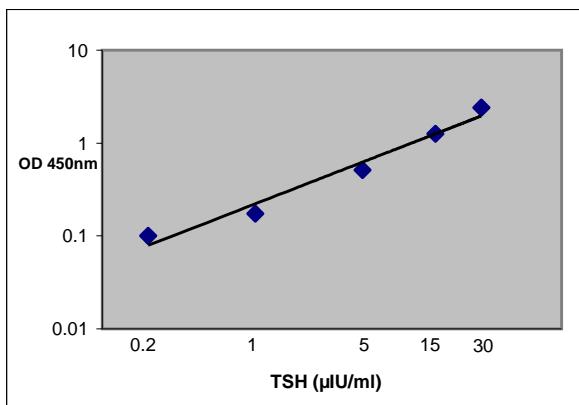
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
3. Subtract the mean absorbance value of the "0" calibrator from the mean absorbance values of the calibrators, control and serum samples.
4. Draw a calibrator curve on log-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
5. Read the values of the unknowns directly off the calibrator curve.
6. If a sample reads more than 30 µIU/ml then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (µIU/ml)
0	0.071	0.073	0.072	0
1	0.100	0.099	0.100	0.2
2	0.177	0.171	0.174	1
3	0.492	0.527	0.510	5
4	1.270	1.254	1.262	15
5	2.391	2.421	2.406	30
Unknown	0.446	0.470	0.458	4.3

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) plus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DiaSource Direct TSH ELISA kit is **0.1 μIU/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The specificity of the Direct TSH ELISA kit was determined by measuring the apparent TSH values of the following compounds:

Substance	Concentration Range	Apparent TSH Value (μIU/ml)
hCG Calibrated against WHO 1st IS 75/537	10,000-50,000 IU/L	<0.15
hFSH Calibrated against WHO 1st 83/575	1000-4000 IU/L	<0.15
hLH Calibrated against WHO 2nd IS 80/552	100-500 IU/L	<0.15

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibrator curve. The results (in μIU/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.52	0.07	13.3
2	1.54	0.10	6.4
3	9.27	0.72	7.7

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in μIU/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.78	0.07	8.3
2	8.03	0.99	12.3
3	25.42	3.26	12.8

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of TSH to three patient serum samples. The results (in μIU/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	1.92	-	-
+0.25	2.31	2.17	106.5
+3.0	5.12	4.92	104.1
+7.5	10.26	9.42	108.9
2 Unspiked	2.01	-	-
+0.25	2.27	2.26	100.4
+3.0	5.10	5.01	101.8
+7.5	9.36	9.51	98.4
3 Unspiked	2.02	-	-
+0.25	2.35	2.27	103.5
+3.0	4.87	5.02	97.0
+7.5	8.57	9.52	90.0

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in μIU/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	9.36	-	-
1:2	4.53	4.68	96.8
1:4	2.31	2.34	98.7
1:8	1.08	1.17	92.3
2	10.89	-	-
1:2	5.65	5.45	103.7
1:4	2.96	2.72	108.8
1:8	1.32	1.36	97.1
3	11.85	-	-
1:2	6.03	5.93	101.7
1:4	2.43	2.96	82.1
1:8	1.18	1.48	79.7

COMPARATIVE STUDIES

The DiaSource Direct TSH ELISA kit (Kit A) was compared with two other competitors ELISA kits (Kit B and Kit C)

The results (in μIU/ml) are tabulated below:

Group	N	Kit A Mean	Kit B Mean	Kit C Mean
Random Males and Females	27	2.97	3.36	2.89

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (μIU/ml)
Normal	0.3-5
Hyperthyroid	<0.15
Hypothyroid	>5.7

REFERENCES

- Allen, K. R., et al., Ann.Clin.Biochem. 22:506, 1985
- Benkirane, M., et al., J.Immunol.Meth. 98:173, 1987
- Carayon, P., et al., Hormone Res. 26:105, 1987
- Carayon, P., et al., Ann. Endocrinol. 40:211, 1979
- Clark, P.M.S., et al., Clin. Chem. 32:88, 1986
- Cornell, J. S., et al., J. Biol. Chem. 248:4327, 1978
- Cusick, C. F., et al., Clin. Chem. 31:348, 1985
- Dumont, J.E., Vitamins Horm. 29:287, 1971
- Dumont, J.E., In Endocrinology(ed:de Groot, L.J., Grune and Stratton Vol. 1. 311-329, 1979
- Evans, M. C., et al., Clin. Endocrinol. 22:445, 1985
- Greenspan, F. S., et al., J. Clin. Endo. Metab. 38:1121, 1974
- Hall, R., et al., Br. Med. J. 1:582, 1971
- Howanitz, P. J., et al., Clin. Chem. 28:427, 1982
- Lower, E. G., et al., Endocrine Rev. 4:213, 1983
- Malter, J. S., et al., Clin. Chem. 31:642, 1985

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2023-06-29



TSH Elisa

es

Para la determinación cuantitativa directa de la hormona estimulante de la tiroide por inmunoensayo enzimático en suero humano

KAPDB4080

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de la hormona estimulante de la tiroide por inmunoensayo enzimático en suero humano.
Solo para diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de este inmunoensayo enzimático sigue el formato típico del ensayo de captura de un paso o ensayo tipo "sandwich". El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales altamente específicos: Un anticuerpo monoclonal específico para TSH se immobiliza en los pocillos de la microplaca y otro anticuerpo monoclonal específico para otra región de la TSH se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se deja que la TSH de la muestra y de los calibradores se unan simultáneamente a la placa y al conjugado HRP. Los pasos de lavado y decantado eliminan todo el conjugado HRP libre. Después del paso de lavado, se añade el sustrato enzimático. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. La absorbancia se mide en un lector de microplacas. La intensidad del color formado por la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de TSH en la muestra.

Se utiliza un grupo de calibradores para trazar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de TSH en las muestras de los pacientes y los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

La hormona estimulante de la tiroide (TSH) es una glicoproteína secretada por la hipófisis anterior. La TSH está formada por dos subunidades llamadas α y β . La subunidad α de la TSH es parecida a la subunidad α encontrada en las hormonas glicoproteicas LH, FSH y hCG. Sin embargo, la subunidad β es específica y varía de una hormona a otra.

Las hormonas tiroideas son secretadas y producidas por la glándula tiroidea. La producción de hormonas tiroideas está regulada por la TSH. Asimismo la TSH actúa como un estimulante del transporte del yoduro y la glándula misma está bajo el control positivo de la TSH. La concentración de las hormonas tiroideas controlan la secreción de la TSH, por lo tanto existe una retroalimentación negativa. Cabe notar que la secreción de las hormonas tiroideas está bajo el efecto positivo directo del sistema nervioso simpático. El componente proteico más importante de la glándula tiroideas es la tiroglobulina, una glicoproteína cuya secreción a la sangre es estimulada por la TSH. Por lo tanto, la TSH juega un papel importante en el correcto funcionamiento y desarrollo de la glándula tiroidea.

Se recomienda analizar tanto la hormona glicoproteica como las hormonas del órgano diana. Por ejemplo, en el hipotiroidismo primario, el nivel sérico de tiroxina es bajo mientras que el nivel de TSH es alto. En el hipotiroidismo secundario, tanto la tiroxina como la TSH están disminuidas. El nivel de la TSH está disminuido en hipertiroidismo.

Actualmente, con todos los ensayos sensibles disponibles, si tuviera que haber solo una prueba disponible para función tiroidea, tendría que ser la prueba de la TSH. Las determinaciones de TSH también son útiles para controlar pacientes que reciben tratamiento de remplazo con tiroxina.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DEL PROCEDIMIENTO

- Los usuarios deben conocer en profundidad este protocolo para el uso correcto de este kit. Un rendimiento confiable solo se logrará mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones suministradas.
- Los materiales de control y las combinaciones de sueros deben incluirse cada vez que se realice un ensayo a nivel alto y bajo para evaluar la confiabilidad de los resultados.
- Cuando se especifica el uso de agua para dilución o reconstitución, utilizar agua desionizada o destilada.
- Con el fin de reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deben usar guantes al manipular los reactivos del kit y muestras humanas.
- Todos los reactivos del kit y las muestras deben estar a temperatura ambiente y se deben mezclar suavemente pero a fondo antes de utilizar. Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos y muestras.
- En cada ensayo se debe incluir una curva de calibración.
- El control se debe incluir en cada ensayo y debe caer entre los límites de confianza establecidos.
- Es posible que técnicas con procedimientos inadecuados, pipeteo impreciso, lavado incompleto así como la conservación incorrecta de reactivos estén

implicados cuando los valores del ensayo para el control no reflejen los rangos establecidos.

9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los pocillos afectará las densidades ópticas (DO). Retirar cuidadosamente todas las burbujas antes de realizar el paso de lectura.

10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se conserva adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación en cuyo caso no se debe utilizar.

11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que el líquido tome contacto con partes metálicas.

12. Para evitar la contaminación de reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezclar diferentes números de lote de componentes del kit, dentro de un ensayo y no utilizar ningún componente después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse como desecho peligroso y deben eliminarse según las normativas nacionales.

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de TSH en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de TSH en saliva, plasma u otros especímenes de origen humano o animal.

2. No utilizar suero que esté extremadamente hemolizado, lipémico, icterico o haya sido almacenado de forma inadecuada.

3. Todas las muestras o sueros de control que contengan azida o timerosal no son compatibles con este kit, ya que pueden conducir a resultados falsos.

4. Para diluir muestras de suero altas solo se debe utilizar el calibrador 0. Si se utiliza otro reactivo puede conducir a resultados falsos.

5. Nunca se deben utilizar los resultados obtenidos con este kit como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la ocurrencia de anticuerpos heterofílicos en pacientes que regularmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente puede causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto, el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales/productos si se sospecha un resultado falso.

6. Algunos individuos pueden tener anticuerpos a proteínas de ratón que posiblemente pueden interferir en este ensayo. Por lo tanto, los resultados de todos los pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos de ratón para diagnóstico o como tratamiento, se deben interpretar con precaución.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL QUE PUEDE PRESENTAR UN PELIGRO BIOLÓGICO

El análisis del suero humano que se utilizó en la preparación de los calibradores y los controles resultó negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y también resultó negativo para los anticuerpos anti VHC y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método puede garantizar la seguridad total de la ausencia de VIH, VHC y el virus de la hepatitis B o de cualquier otro agente infeccioso. Los reactivos deben considerarse como un peligro biológico potencial y se deben manipular con las mismas precauciones que se aplican a cualquier muestra de sangre.

RIESGO QUÍMICO

Evitar el contacto con reactivos que contienen TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si entra en contacto con cualquiera de estos reactivos, lavar con abundante agua. Se sospecha que TMB es cancerígeno.

TOMA DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

Se necesitan aproximadamente 0,2 ml de suero para una determinación en duplicado. Tomar 4-5 ml de sangre en un tubo correctamente etiquetado y dejarlo coagular. Centrifugar y separar cuidadosamente la capa de suero. Almacenar a 4°C hasta 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más tarde. Considerar todas las muestras humanas como material potencialmente biopeligroso y tomar las precauciones adecuadas al manipularlas.

TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA

Este ensayo es un sistema directo; no es necesario el tratamiento previo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión que dispensen 50, 100, 150 y 300 μ l
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de microplacas
5. Lector de microplacas con filtro a 450nm y un límite superior de DO de 3,0 o más alto* (consultar el paso 10 del procedimiento del ensayo).

REACTIVOS SUMINISTRADOS

TMB Pocillos de microplaca desprendibles recubiertos con anticuerpo anti TSH de ratón – Listos para usar.

Contenido: Una microplaca de 96 pocillos (12x8) recubiertos con anticuerpo monoclonal en una bolsa resellable con desecante.

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Ab HRP CONC Concentrado del conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) con anti TSH de ratón – 50X

Contenido: conjugado HRP con anticuerpo anti TSH monoclonal en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 300 μ l/vial

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Preparación: Diluir 1:50 en tampón del ensayo antes de utilizar (p. ej. 40 μ l de HRP en 2 ml de tampón del ensayo). Si utiliza toda la placa diluir 240 μ l de HRP en 12 ml de tampón del ensayo. Eliminar todo lo que sobre.

CAL N Calibradores TSH – Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: Seis viales de TSH en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo una cantidad definida de TSH a un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

1 μ IU del calibrador es equivalente a 1 μ IU del 2nd IIS 80/558.

*Las concentraciones aproximadas están en la siguiente tabla, consultar la etiqueta de los viales para obtener las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 μ IU/ml	2,0 ml
Calibrador 1	0,2 μ IU/ml	0,5 ml
Calibrador 2	1 μ IU/ml	0,5 ml
Calibrador 3	5 μ IU/ml	0,5 ml
Calibrador 4	15 μ IU/ml	0,5 ml
Calibrador 5	30 μ IU/ml	0,5 ml

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos los calibradores deben utilizarse dentro de 14 días o alicuotados y conservados congelados. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL Controles – Listo para usar.

Contenido: Dos viales de TSH en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de TSH a un tampón. Consultar la etiqueta del vial para obtener el valor esperado y rango aceptable.

Volumen: 0,5 ml/vial

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abierto se debe utilizar dentro de 14 días o alicuotado y conservado congelado. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

WASH SOLN CONC Tampón de lavado concentrado – 10X

Contenido: Una botella de tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.

Volumen: 50 ml/botella

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Preparación: Diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizar. Si utiliza toda la placa diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

ASS BUF Tampón del ensayo – Listo para usar.

Contenido: Un vial de tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 15 ml/botella

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

CHROM TMB

Sustrato TMB – Listo para usar.

Contenido: Una botella de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF ni DMSO.

Volumen: 16 ml/botellas

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

STOP SOLN

Solución de parada – Lista para usar.

Contenido: Un vial de ácido sulfúrico 1M.

Volumen: 6 ml/botella

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Tratamiento previo de la muestra:

Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse en duplicado. Una vez que el procedimiento se ha iniciado, todos los pasos se deben completar sin interrupción.

1. Preparar la solución de trabajo del el conjugado HRP- anti TSH y el tampón de lavado.
2. Sacar el número necesario de tiras de microplaca. Volver a sellar la bolsa y devolver las tiras no utilizadas al frigorífico.
3. Pipetear 50 μ l de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondientes etiquetados en duplicado.
4. Pipetear 100 μ l de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (Recomendamos utilizar una pipeta multicanal).
5. Incubar en un agitador de microplacas (aproximadamente 200 rpm) durante 90 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar los pocillos 3 veces con 300 μ l de tampón de lavado diluido por pocillo y golpear la placa firmemente sobre un papel absorbente para asegurar que esté seca. (Se recomienda utilizar un lavador automático).
7. Pipetear 150 μ l de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos medidos.
8. Incubar en un agitador de microplacas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador F adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
9. Pipetear 50 μ l de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos medidos del paso 7.
10. Leer la placa en un lector de microplacas a 450 nm dentro de 20 minutos después de añadir la solución de parada.

* Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si el filtro de 450 nm no está disponible, se puede sustituir por un filtro de 415 nm. Las densidades ópticas serán menores, sin embargo, esto no afectará los resultados de las muestras de control/pacientes.

CÁLCULOS

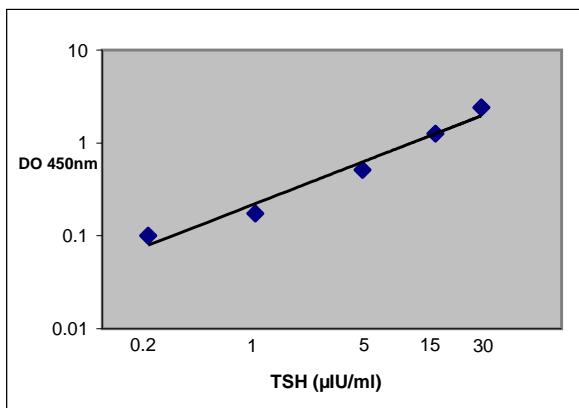
1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Calcular la densidad óptica promedio de cada muestra desconocida en duplicado.
3. Restar el valor promedio de absorbancia del calibrador "0" de los valores de absorbancia promedio de los calibradores, control y muestras de suero.
4. Trazar una curva de calibración en papel log-log con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. Si está utilizando software de inmunoensayo, se recomienda una curva de calibración de 4 parámetros.
5. Leer los valores de las muestras desconocidas directamente de la curva de calibración.
6. Si la lectura de una muestra es mayor de 30 μ IU/ml diluir con calibrador 0 a una dilución no mayor de 1:8. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

TABLA DE DATOS TÍPICOS

Calibrador	DO 1	DO 2	DO promedio	Valor ($\mu\text{IU}/\text{ml}$)
0	0,071	0,073	0,072	0
1	0,100	0,099	0,100	0,2
2	0,177	0,171	0,174	1
3	0,492	0,527	0,510	5
4	1,270	1,254	1,262	15
5	2,391	2,421	2,406	30
Desconocido	0,446	0,470	0,458	4,3

CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

Curva de ejemplo solamente. **No** utilizar para calcular resultados.



CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

El límite inferior de detección se calcula a partir de la curva de calibración determinando la concentración resultante de la DO promedio del Calibrador 0 (basado en el análisis de 10 muestras replicadas) más 2 DE. Por lo tanto la sensibilidad del kit DiSource Direct TSH ELISA es **0,1 $\mu\text{IU}/\text{ml}$** .

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

La especificidad del kit Direct TSH ELISA se determinó midiendo los valores aparentes de TSH de los siguientes compuestos:

Sustancia	Rango de concentración	Valor aparente de TSH ($\mu\text{IU}/\text{ml}$)
hCG Calibrado con WHO 1st IS 75/537	10000-50000 IU/l	<0,15
hFSH Calibrado con WHO 1st 83/575	1000-4000 IU/l	<0,15
hLH Calibrado con WHO 2nd IS 80/552	100-500 IU/l	<0,15

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Tres muestras se analizaron diez veces cada una en la misma curva de calibración. Los resultados (en $\mu\text{IU}/\text{ml}$) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	0,52	0,07	13,3
2	1,54	0,10	6,4
3	9,27	0,72	7,7

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Tres muestras fueron analizadas diez veces durante un periodo de cuatro semanas. Los resultados (en $\mu\text{IU}/\text{ml}$) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	0,78	0,07	8,3
2	8,03	0,99	1,3
3	25,42	3,26	12,8

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras añadiéndoles cantidades definidas de TSH a tres muestras de suero de pacientes. Los resultados (en $\mu\text{IU}/\text{ml}$) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultado observado	Resultado esperado	Recuperación%
1sinTSH añadida +0,25 +3,0 +7,5	1,92	-	-
	2,31	2,17	106,5
	5,12	4,92	104,1
	10,26	9,42	108,9
	-	-	-
2 sinTSH añadida +0,25 +3,0 +7,5	2,01	-	-
	2,27	2,26	100,4
	5,10	5,01	101,8
	9,36	9,51	98,4
	-	-	-
3 sinTSH añadida +0,25 +3,0 +7,5	2,02	-	-
	2,35	2,27	103,5
	4,87	5,02	97,0
	8,57	9,52	90,0
	-	-	-

LINEALIDAD

Tres sueros de pacientes se diluyeron con el calibrador 0. Los resultados (en $\mu\text{IU}/\text{ml}$) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultado observado	Resultado esperado	Recuperación%
1 1:2 1:4 1:8	9,36	-	-
	4,53	4,68	96,8
	2,31	2,34	98,7
	1,08	1,17	92,3
2 1:2 1:4 1:8	10,89	-	-
	5,65	5,45	103,7
	2,96	2,72	108,8
	1,32	1,36	97,1
3 1:2 1:4 1:8	11,85	-	-
	6,03	5,93	101,7
	2,43	2,96	82,1
	1,18	1,48	79,7

ESTUDIOS COMPARATIVOS

El kit DiSource Direct TSH ELISA (Kit A) se comparó con dos otros kit ELISA de la competencia (Kit B y Kit C)

Los resultados (en $\mu\text{IU}/\text{ml}$) se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	N	Promedio del Kit A	Promedio del Kit B	Promedio del Kit C
Hombres y mujeres al azar	27	2,97	3,36	2,89

VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe recolectar sus datos y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	Rango ($\mu\text{IU}/\text{ml}$)
Normal	0,3-5
Hipertiroideo	<0,15
Hipotiroido	>5,7

REFERENCIAS

- Allen, K. R., et al., Ann.Clin.Biochem. 22:506, 1985
- Benkirane, M., et al., J.Immunol.Meth. 98:173, 1987
- Carayon, P., et al., Hormone Res. 26:105, 1987
- Carayon, P., et al., Ann. Endocrinol. 40:211, 1979
- Clark, P.M.S., et al., Clin. Chem. 32:88, 1986
- Cornell, J. S., et al., J. Biol. Chem. 248:4327, 1978
- Cusick, C. F., et al., Clin. Chem. 31:348, 1985
- Dumont, J.E., Vitamins Horm. 29:287, 1971
- Dumont, J.E., In Endocrinology(ed:de Groot, L.J., Grune and Stratton Vol. 1. 311-329, 1979
- Evans, M. C., et al., Clin. Endocrinol. 22:445, 1985
- Greenspan, F. S., et al., J. Clin. Endo. Metab. 38:1121, 1974
- Hall, R., et al., Br. Med. J. 1:582, 1971
- Howanitz, P. J., et al., Clin. Chem. 28:427, 1982
- Lower, E. G., et al., Endocrine Rev. 4:213, 1983
- Malter, J. S., et al., Clin. Chem. 31:642, 1985

Fecha de revisión : 2023-06-29