

## Instructions for Use

# TSH (ultrasensitive) ELISA



**REF** EIA-1790

 96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.  
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.  
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

## Table of Contents / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	INTRODUCTION.....	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY .....	2
4	REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED .....	2
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	2
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
7	STORAGE CONDITIONS .....	3
8	INSTRUMENTATION.....	3
9	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	3
10	PROCEDURAL NOTES .....	3
11	REAGENT PREPARATION .....	3
12	ASSAY PROCEDURE .....	3
13	CALCULATION OF RESULTS.....	4
14	EXPECTED VALUES.....	5
15	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	5
16	QUALITY CONTROL .....	8
17	STANDARDIZATION .....	8
18	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	8
19	REFERENCES.....	9
1	USO PREVISTO .....	10
2	INTRODUCCIÓN .....	10
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO .....	10
4	REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS.....	10
5	MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS .....	10
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	11
7	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO .....	11
8	INSTRUMENTOS.....	11
9	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	11
10	NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO .....	11
11	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS .....	11
12	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO .....	12
13	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....	12
14	VALORES PREVISTOS.....	13
15	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	13
16	CONTROL DE CALIDAD .....	16
17	ESTANDARIZACIÓN .....	16
18	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	16
19	REFERENCIAS.....	17
	SYMBOLS USED.....	18

## 1 INTENDED USE

For the quantitative determination of thyroid stimulating hormone (TSH) concentration in human serum. The assay is useful in the diagnosis of thyroid or pituitary disorders.

## 2 INTRODUCTION

The determination of serum or plasma levels of thyroid stimulating hormone (TSH or thyrotropin) is recognized as an important measurement in the assessment of thyroid function.<sup>1</sup> Thyroid stimulating hormone is secreted by the anterior lobe of the pituitary gland, and induces the production and release of thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) from the thyroid gland.<sup>2</sup> It is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 28,000 daltons, consisting of two chemically different subunits, alpha and beta.<sup>3</sup>

Although the concentration of TSH in the blood is extremely low, it is essential in the maintenance of normal thyroid function. The release of TSH is regulated by a TSH-releasing hormone (TRH) produced by the hypothalamus. The levels of TSH and TRH are inversely related to the level of thyroid hormone. When there is a high level of thyroid hormone in the blood, less TRH is released by the hypothalamus, so less TSH is secreted by the pituitary. The opposite action will occur when there are decreased levels of thyroid hormones in the blood. This process, known as a negative feedback mechanism, is responsible for maintaining the proper blood levels of these hormones.<sup>4,5</sup>

Conventional TSH assays are generally accepted as an important tool in the diagnosis of primary and secondary hypothyroidism<sup>1</sup>, but offer limited clinical utility in the assessment of hyperthyroidism (overactive thyroid) due to a lack of sensitivity. The Ultrasensitive-TSH ELISA (U-TSH) offers a sensitivity of 0.05  $\mu$ U/mL and hence allows discrimination between hyperthyroid and normal patient populations. The assay is intended to quantitatively measure TSH in human serum with 2<sup>nd</sup> generation sensitivity. The U-TSH ELISA can be used as an aid in the assessment of thyroid status, and diagnosis and treatment of thyroid disease.

## 3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Ultrasensitive-TSH ELISA Test is based on the principle of a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay.<sup>6,7</sup> The assay system utilizes a unique monoclonal antibody directed against a distinct antigenic determinant on the intact TSH molecule. Mouse monoclonal anti-TSH antibody is used for solid phase (microtiter wells) immobilization, and goat anti-TSH antibody is used in the antibody-enzyme (horseradish peroxidase) conjugate solution. The test sample is allowed to react simultaneously with the antibodies, resulting in the TSH molecule being sandwiched between the solid phase and enzyme-linked antibodies. After a 2 hour incubation at room temperature with shaking, the solid phase is washed with deionized water to remove unbound labeled antibodies. A solution of tetramethylbenzidine (TMB) is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue color. The color development is stopped with the addition of 1N HCl, and the resulting yellow color is measured spectrophotometrically at 450 nm. The concentration of TSH is directly proportional to the color intensity of the test sample.

## 4 REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

- 1. Antibody-Coated Wells (1 plate, 96 wells)**  
Microtiter wells coated with mouse monoclonal anti-TSH.
- 2. Enzyme Conjugate Reagent (1 vial, 13 mL)**  
Contains goat anti-TSH conjugated to horseradish peroxidase.
- 3. Reference Standard Set (1 mL/vial)**  
Contains 0, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0 and 10.0  $\mu$ U/mL (WHO, 2<sup>nd</sup> IRP, 80/558) TSH in equine serum with preservatives.  
Lyophilized. See instructions for reconstitution under Reagent Preparation.
- 4. TMB Reagent (1 bottle, 11 mL)**  
Contains 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) stabilized in buffer solution.
- 5. Stop Solution (1N HCl) (1 bottle, 11 mL)**  
Contains diluted hydrochloric acid.

## 5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Deionized water
- Precision pipettes: 0.05, 0.1, 0.2, and 1 mL
- Disposable pipette tips
- Microtiter well reader capable of reading absorbance at 450 nm.
- Orbital motion microtiter well shaker, capable of shaking at a speed of  $175 \pm 25$  RPM
- Absorbent paper
- Log-log graph paper
- Quality control material (e.g., BioRad Lyphochek Control sera)

## 6 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. CAUTION: Test methods are not available which can offer complete assurance that Hepatitis B virus, Human Immunodeficiency Virus (HIV/HTLV-III/LAV), or other infectious agents are absent from the reagents in this kit. Therefore, all human blood products, including serum samples, should be considered potentially infectious. Handling should be as defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation, where it exists.<sup>8</sup>
2. Avoid contact with 1N HCl. It may cause skin irritation and burns. If contact occurs, wash with copious amounts of water and seek medical attention if irritation persists.
3. Do not use reagents after expiration date.
4. Do not mix or use components from kits with different lot numbers.
5. Replace caps on reagents immediately. Do not switch caps.
6. Solutions containing additives or preservatives, such as sodium azide, should not be used in the enzyme reaction.
7. Do not pipette reagents by mouth.
8. For in vitro diagnostic use.

## 7 STORAGE CONDITIONS

1. Store the unopened kit at 2 °C – 8 °C upon receipt and when it is not in use, until the expiration shown on the kit label. Refer to the package label for the expiration date.
2. The opened and used reagents, with the exception of the lyophilized standards, are stable until the expiration date if stored properly at 2 °C – 8 °C.
3. Keep microtiter plate in a sealed bag with desiccant to minimize exposure to damp air.
4. Reconstituted standards will be stable for up to 30 days when stored sealed at 2 °C – 8 °C.

## 8 INSTRUMENTATION

A microtiter well reader with a bandwidth of 10 nm or less and an optical density range of 0 to 2 OD or greater at 450 nm wavelength is acceptable for absorbance measurement.

An orbital motion microtiter plate shaker is necessary for the 2 hour incubation.

## 9 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. Serum should be prepared from a whole blood specimen obtained by acceptable medical techniques. This kit is for use with serum samples without additives only. Avoid grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples.
2. Specimens should be capped and may be stored for up to 48 hours at 2 °C – 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

## 10 PROCEDURAL NOTES

1. Manual Pipetting:  
It is recommended that no more than 32 wells be used for each assay run. Pipetting of all standards, samples, and controls should be completed within 3 minutes.
2. Automated Pipetting:  
A full plate of 96 wells may be used in each assay run. However, it is recommended that pipetting of all standards, samples, and controls be completed within 3 minutes.
3. All standards, samples, and controls should be run in duplicate concurrently so that all conditions of testing are the same.
4. It is recommended that the wells be read within 15 minutes following addition of Stop Solution.

## 11 REAGENT PREPARATION

1. All reagents should be allowed to reach room temperature (18 °C – 25 °C) before use.
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Reconstitute each lyophilized standard with 1.0 mL dH<sub>2</sub>O. Allow the reconstituted material to stand for at least 20 minutes. Reconstituted standards should be stored sealed at 2 °C – 8 °C, and are stable at 2 °C – 8 °C for at least 30 days.

## 12 ASSAY PROCEDURE

1. Secure the desired number of coated wells in the holder.
2. Dispense 100 µL of standards, specimens, and controls into appropriate wells.

3. Dispense 100  $\mu$ L of Enzyme Conjugate Reagent into each well.
4. Thoroughly mix for 30 seconds. It is very important to have complete mixing.
5. Incubate at room temperature (18 °C – 25 °C) with shaking at 450 RPM for 120 minutes (2 hours).
6. Remove the incubation mixture by flicking plate contents into a waste container.
7. Rinse and flick the microtiter wells 5 times with deionized water. (Please do not use tap water.)
8. Strike the wells sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual water droplets.
9. Dispense 100  $\mu$ L of TMB Reagent into each well. Gently mix for 10 seconds.
10. Incubate at room temperature, for 20 minutes.
11. Stop the reaction by adding 100  $\mu$ L of Stop Solution into each well.
12. Gently mix for 30 seconds. **Ensure that all of the blue color changes completely to yellow.**
13. Read OD at 450 nm with a microtiter well reader **within 15 minutes.**

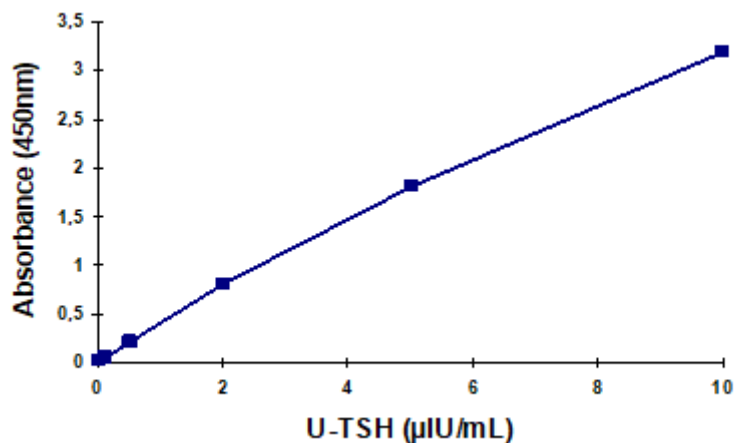
### 13 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance value (A450) for each set of reference standards, controls and samples.
2. Using log-log graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained for each reference standard against its concentration in  $\mu$ IU/mL, with absorbance on the vertical (y) axis and concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration of TSH in  $\mu$ IU/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.
4. Any diluted samples must be further corrected by the appropriate dilution factor.

#### 13.1 Example of Standard Curve

Results of a typical standard run with absorbency readings at 450 nm shown in the Y axis against TSH concentrations shown in the X axis. This standard curve is for the purpose of illustration only, and should not be used to calculate unknowns.

TSH ( $\mu$ IU/mL)	Absorbance (450 nm)
0	0.009
0.1	0.050
0.5	0.218
2	0.801
5	1.800
10	3.191



## 14 EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own normal range based on patient population. Differences in assay technique and the use of various standards may affect results.

The results provided below are based on 43 normal and 73 hyperthyroid blood specimens. The ranges were determined from the mean  $\pm$  2SD ( $\mu$ IU/mL TSH). These values may differ from other published data.

	Normal	Hyperthyroid
N	43	73
Mean TSH ( $\mu$ IU/mL)	1.84	< 0.07
Range	0.54 - 4.72	< 0.07 – 0.20

## 15 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 15.1 Accuracy

The U-TSH ELISA (EIA-1790) has been compared to the Diagnostic Products Corporation's Immulite 2000 3<sup>rd</sup> Generation TSH test and is substantially equivalent in that the methods used are for the quantitative determination of TSH in human serum. Likewise, both methods use TSH calibrated and labeled in  $\mu$ IU/mL standardized to the WHO hTSH (2<sup>nd</sup> IRP, 80/558).

A study was conducted using 62 euthyroid and hypothyroid patient samples (as determined by hospital laboratory analysis). The range of samples tested was 0.4  $\mu$ IU/mL to 62  $\mu$ IU/mL. The comparison demonstrated good correlation with another commercial kit as shown below:

N	= 62
Correlation coefficient	= 0.997
Slope	= 1.032
Intercept	= 0.240
EIA-1790 Mean	= 8.31 $\mu$ IU/mL
DPC Mean	= 8.82 $\mu$ IU/mL

Another 73 hyperthyroid patient samples also correlated well with the DPC test kit:

	# Samples [TSH] $\leq$ 0.1 $\mu$ IU/mL	# Samples [TSH] $\leq$ 0.4 $\mu$ IU/mL [TSH] > 0.1 $\mu$ IU/mL
DPC Kit	N = 71	N = 2
EIA-1790 Kit	N = 67	N = 6

Note: The six patient samples with TSH concentration greater than 0.1  $\mu$ IU/mL in the EIA-1790 test had concentrations of less than 0.4  $\mu$ IU/mL, which is still in the hyperthyroid range (< 0.4  $\mu$ IU/mL).

### 15.2 Sensitivity

Based on the 20% interassay CV of two low-end TSH data-points (0.07  $\mu$ IU/mL and 0.1  $\mu$ IU/mL), the functional sensitivity of the U-TSH assay was determined to be 0.054  $\mu$ IU/mL.<sup>9</sup>

### 15.3 Precision

#### 15.3.1 Intra-Assay Precision

Within-run precision was determined by replicate determinations of five different serum samples in one assay. Within-assay variability is shown below:

Serum Sample	1	2	3	4	5
Number of Replicates	20	20	20	20	20
Mean TSH ( $\mu$ IU/mL)	0.11	0.26	0.49	3.90	9.68
Standard Deviation	0.01	0.02	0.04	0.25	0.74
Coefficient of Variation (%)	9.2	7.7	8.2	6.4	7.6

**15.3.2 Inter-Assay Precision**

Between-run precision was determined by replicate measurements of five different serum samples over a series of individually calibrated assays. Between-assay variability is shown below:

<b>Serum Sample</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Number of Replicates	30	30	30	30	30
Mean TSH ( $\mu\text{IU/mL}$ )	0.11	0.31	0.48	3.96	8.89
Standard Deviation	0.02	0.04	0.04	0.31	0.68
Coefficient of Variation (%)	12.9	12.9	9.8	7.8	7.6

**15.4 Recovery and Linearity Studies****15.4.1 Recovery**

For each concentration, two patient serum samples of known TSH levels were combined and assayed in duplicate. The average recovery was 104%.

<b>Expected Concentration (<math>\mu\text{IU/mL}</math>)</b>	<b>Observed Concentration (<math>\mu\text{IU/mL}</math>)</b>	<b>% Recovery</b>
1.14	1.21	106%
1.65	1.75	106%
3.03	2.98	98%
4.56	4.58	100%
6.05	6.40	106%
13.20	13.90	105%

**15.4.2 Linearity**

Four samples were serially diluted with sample diluent to determine linearity. The average recovery was 97.3%.

#	Dilution	Expected Conc. ( $\mu\text{U/mL}$ )	Observed Conc. ( $\mu\text{U/mL}$ )	% Expected
1.	Undiluted		14.6	
	1:2	7.30	7.26	99%
	1:4	3.65	3.38	93%
	1:8	1.83	1.66	91%
	1:16	0.91	0.79	87%
	1:32	0.46	0.39	85%
	1:64	0.23	0.19	83%
			Average = 90%	
2.	Undiluted		14.2	
	1:2	7.10	7.22	102%
	1:4	3.55	3.41	96%
	1:8	1.78	1.95	110%
	1:16	0.89	1.00	112%
	1:32	0.44	0.46	105%
	1:64	0.22	0.23	105%
1:128	0.44	0.09	82%	
			Average = 102%	
3.	Undiluted		3.49	
	1:2	1.75	1.80	103%
	1:4	0.87	0.93	107%
	1:8	0.44	0.48	109%
	1:16	0.22	0.24	109%
	1:32	0.11	0.11	100%
			Average = 106%	
4.	Undiluted		2.56	
	1:2	1.28	1.19	93%
	1:4	0.64	0.62	97%
	1:8	0.32	0.29	91%
	1:16	0.16	0.14	88%
1:32	0.08	0.07	88%	
			Average = 91%	



**15.5 Specificity**

The following hormones were tested for cross-reactivity:

HORMONE TESTED	CONCENTRATION	PRODUCED INTENSITY EQUIVALENT to TSH ( $\mu\text{U/mL}$ )
HCG - (WHO 1st IRP 75/537)	1,000 mIU/mL	0
	5,000 mIU/mL	0
	10,000 mIU/mL	0
	50,000 mIU/mL	0
	100,000 mIU/mL	0
	250,000 mIU/mL	0
	500,000 mIU/mL	0
FSH - (WHO 2nd IRP-HMG)	100 mIU/mL	0.00
	250 mIU/mL	0.00
	500 mIU/mL	0.10
	750 mIU/mL	0.18
LH - (WHO 1st IRP 68/40)	100 mIU/mL	0.06
	250 mIU/mL	0.13
	500 mIU/mL	0.15
	750 mIU/mL	0.18
Prolactin - (WHO 1st IRP 75/504)	100 ng/mL	0
	250 ng/mL	0
	500 ng/mL	0
	750 ng/mL	0
	1000 ng/mL	0
hGH - (WHO 1st IRP 65/217)	50 ng/mL	0
	100 ng/mL	0
	200 ng/mL	0
	400 ng/mL	0

**15.6 Hook Effect**

No hook effect is observed in this assay at TSH concentrations up to 1,000  $\mu\text{U/mL}$ .

**16 QUALITY CONTROL**

Good laboratory practice requires that quality control specimens (controls) be run with each calibration curve to verify assay performance. To assure proper performance, a statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges. Controls containing sodium azide should not be used.

**17 STANDARDIZATION**

The TSH Reference Standards are calibrated against the World Health Organization's Second International Reference Preparation of hTSH 2<sup>nd</sup> IRP-80/558).

**18 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out with a complete understanding of the package insert instructions and with adherence to good laboratory practice.
- For professional use only. The results obtained from the use of this kit should be used only as an adjunct to other diagnostic procedures and information available to the physician.
- Serum samples demonstrating gross lipemia, gross hemolysis, or turbidity should not be used with this test.
- The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
- The EIA-1790 U-TSH assay has not been tested on newborns, and is not for use in screening newborns.
- If the device fails to perform, use alternative diagnostic procedure or consult manufacturer.

**19 REFERENCES**

1. Marshall, J.C.: Clinic. In Endocrinol. Metab., 4:545 (1975).
2. Jeffcoate, S.L.: Clinic. In Endocrinol. Metab. 4: 521 (1975).
3. Cohen, K.L.: Metabolism, 26:1165 (1977).
4. Shome, B. and Parlow, A.F.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:199 (1974).
5. Lundy, L.E., Lee, S.G., Levy, W., et. al: Obstet. Gynecol., 44:14 (1974).
6. Catt, K.J. and Pierce, J.G.: Reprod. Endocrinol., Chapter 2, Ed: S.S.C. Yen and R.B. Jaffe, Philadelphia (1978).
7. Leonard, J.M., Leach, R.B., Couture, M. and Paulsen, C.A.: J. Clin. Endocrinol., 34:209 (1972).
8. USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.
9. Spencer, C.A., et. al., Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. Clin. Chem. 42:1 (1996).

## 1 USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa de la concentración de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero humano. El ensayo es útil para el diagnóstico de trastornos tiroideos o pituitarios.

## 2 INTRODUCCIÓN

La determinación de los niveles de hormona estimulante de la tiroides (TSH o tiotropina) en suero o plasma es una medida importante para la valoración de la función tiroidea.<sup>1</sup> La hormona estimulante de la tiroides es secretada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria e induce la producción y liberación de tiroxina (T4) y triiodotironina (T3) de la glándula tiroidea.<sup>2</sup> Se trata de una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 28.000 Dalton, formada por dos subunidades químicas diferenciadas: alfa y beta.<sup>3</sup>

Aunque la concentración de TSH en la sangre es extremadamente baja, es esencial para el mantenimiento de la función tiroidea normal. La liberación de TSH está regulada por una hormona liberadora de TSH (TRH) segregada por el hipotálamo. Los niveles de TSH y TRH están inversamente relacionados con el nivel de la hormona tiroidea. Cuando el nivel de hormona tiroidea en sangre es elevado, el hipotálamo libera menos TRH, por lo que la pituitaria secreta menos TSH. Lo contrario puede suceder cuando disminuye el nivel de hormona tiroidea en sangre. Este proceso, conocido como mecanismo de retroalimentación negativa, es el responsable de mantener los niveles adecuados en sangre de estas hormonas.<sup>4,5</sup>

Los ensayos de TSH convencionales están aceptados como herramienta importante para el diagnóstico del hipotiroidismo<sup>1</sup> primario y secundario, pero su utilidad clínica para la determinación del hipertiroidismo (tiroides hiperactiva) es limitada como consecuencia de la falta de sensibilidad. El ensayo Ultrasensitive-TSH ELISA (U-TSH) ofrece una sensibilidad de 0,05  $\mu\text{UI/mL}$ , lo que permite la discriminación entre la población con tiroides normal e hipertiroidismo. El ensayo se ha diseñado para la medición cuantitativa de TSH en suero humano con sensibilidad de 2ª generación. U-TSH ELISA puede utilizarse como ayuda para la determinación del estado de la tiroides, así como para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad tiroidea.

## 3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo Ultrasensitive-TSH ELISA se basa en el principio de un ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida.<sup>6,7</sup> El sistema del ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal único dirigido contra un determinante antigénico diferente en la molécula de TSH intacta. Se utiliza un anticuerpo anti-TSH monoclonal de ratón para la inmovilización en fase sólida (pocillos de microtítulo) y un anticuerpo anti-TSH de cabra en la solución de conjugado de anticuerpo con enzima (peroxidasa de remolacha). La muestra de la prueba reacciona simultáneamente con los anticuerpos, lo que genera un compuesto sándwich en la molécula TSH entre los anticuerpos en fase sólida y ligados a enzimas. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación, la fase sólida se lava con agua desionizada para eliminar los anticuerpos etiquetados no ligados. A continuación se añade una solución de tetrametilbenzidina (TMB) y se incuba durante 20 minutos, lo que genera un color azul. El desarrollo del color se detiene añadiendo HCl 1N, y el color amarillo resultante se mide mediante espectrofotometría a 450 nm. La concentración de TSH es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de la prueba.

## 4 REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

- 1. Antibody-Coated Wells** (Pocillos recubiertos de anticuerpos) **(1 placa, 96 pocillos)**  
Pocillos de microtítulos recubiertos con anticuerpos monoclonales anti-TSH de ratón.
- 2. Enzyme Conjugate Reagent** (Reactivo de conjugado enzimático) **(1 vial, 13 mL)**  
Contiene anti-TSH de cabra conjugado con peroxidasa de remolacha.
- 3. Reference Standard Set** (Conjunto estándar de referencia) **(1 mL/vial)**  
Contiene 0, 0,1, 0,5, 2,0, 5,0 y 10,0  $\mu\text{UI/mL}$  (2º IRP de la OMS, 80/558)  
TSH en suero equino con conservantes.  
Liofilizado. Consulte las instrucciones para la reconstitución en el apartado Preparación de los reactivos.
- 4. TMB Reagent** (Reactivo TMB) **(1 frasco, 11 mL)**  
Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada en solución de tampón.
- 5. Stop Solution** (Solución de parada) **(HCl 1N) (1 frasco, 11 mL)**  
Contiene ácido clorhídrico diluido.

## 5 MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua desionizada
- Pipetas de precisión: 0,05, 0,1, 0,2 y 1 mL
- Puntas de pipeta desechables
- Lector para pocillos de microtítulo con capacidad de leer la absorbancia a 450 nm.
- Agitador orbital de pocillos de microtítulo, con capacidad de agitación a una velocidad de  $175 \pm 25$  rpm.

- Papel absorbente
- Papel milimetrado
- Material de control de calidad (p. ej., suero de control BioRad Lyphochek)

## 6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. PRECAUCIÓN: no existen métodos de prueba que ofrezcan una garantía total de ausencia del virus de la hepatitis B, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV/HTLV-III/LAV) u otros agentes infecciosos en los reactivos de este kit. Por lo tanto, todos los productos sanguíneos humanos, incluidas las muestras de suero, deben tratarse como potencialmente infecciosos. La manipulación debe realizarse conforme a las directrices o normativas nacionales pertinentes sobre seguridad contra riesgos biológicos, si existen.<sup>8</sup>
2. Evite el contacto con HCl 1N. Puede provocar irritación cutánea y quemaduras. En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte con el médico si persiste la irritación.
3. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
4. No mezcle ni utilice componentes de kits con números de lote distintos.
5. Vuelva a tapar los reactivos de inmediato. No intercambie los tapones.
6. No deben utilizarse soluciones que contengan aditivos o conservantes, como la azida sódica, en la reacción enzimática.
7. No pipetee los reactivos con la boca.
8. Para uso de diagnóstico *in vitro*.

## 7 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit sin abrir a 2 °C – 8 °C tras recibirlo y cuando no lo utilice, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Consulte la etiqueta del envase para conocer la fecha de caducidad.
2. Los reactivos abiertos y utilizados, a excepción de los estándares liofilizados, se mantienen estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan correctamente a 2 °C – 8 °C.
3. Mantenga la placa de microtítulo en una bolsa sellada con desecante para minimizar la exposición a la humedad.
4. Los estándares reconstituidos se mantienen estables hasta 30 días si se almacenan cerrados a 2 °C - 8 °C.

## 8 INSTRUMENTOS

Un lector de placas de microtítulo con un ancho de banda de 10 nm o menos y un rango de densidad óptica de 0 a 2 DO o superior a una longitud de onda de 450 nm es aceptable para la medición de la absorbancia.

Se necesita un agitador orbital de placas de microtítulo para la incubación de 2 horas.

## 9 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. El suero debe prepararse a partir de una muestra de sangre total obtenida con técnicas médicas adecuadas. Este kit es de uso exclusivo con muestras de suero sin aditivos. Evite el uso de muestras extremadamente hemolíticas, lipémicas o turbidas.
2. Las muestras deberían taparse y pueden almacenarse hasta 48 horas a 2 °C – 8 °C antes del análisis. Las muestras conservadas por un periodo más prolongado deben congelarse una sola vez a –20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes de realizar la prueba.

## 10 NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Pipeteo manual:  
Se recomienda no utilizar más de 32 pocillos por cada serie de ensayo. El pipeteo de todos los estándares, las muestras y los controles debería completarse en un tiempo de 3 minutos.
2. Pipeteo automático:  
Puede utilizarse una placa de 96 pocillos en cada serie de ensayo. Sin embargo, es recomendable que el pipeteo de todos los estándares, las muestras y los controles se complete en un tiempo de 3 minutos.
3. Todos los estándares, las muestras y los controles deben analizarse por duplicado simultáneamente para que todas las condiciones de la prueba sean idénticas.
4. Es recomendable realizar la lectura de los pocillos durante los 15 minutos posteriores a la incorporación de la solución de parada.

## 11 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18 °C – 25 °C) antes de utilizarlos.

2. Todos los reactivos deben mezclarse con suavidad, antes de su uso, invirtiéndolos o girándolos. Evite la formación de espuma.
3. **Reconstituya** cada estándar liofilizado con **1,0 mL** de agua destilada. Deje reposar el material reconstituido durante 20 minutos como mínimo. Los estándares reconstituidos deberían almacenarse tapados a 2 °C – 8 °C y se mantienen estables a 2 °C – 8 °C durante 30 días como mínimo.

## 12 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pocillos recubiertos en el soporte.
2. Dispense 100 µL de estándares, muestras y controles en los pocillos correspondientes.
3. Dispense 100 µL de reactivo de conjugado enzimático en cada pocillo.
4. Mezcle bien durante 30 segundos. Es muy importante realizar bien la mezcla.
5. Deje incubar a temperatura ambiente (18 °C – 25 °C) con agitación a 450 RPM durante 120 minutos (2 horas).
6. Retire la mezcla de incubación sacudiendo el contenido de la placa en un contenedor de residuos.
7. Enjuague y sacuda los pocillos de microtítulo 5 veces con agua desionizada. (No utilice agua del grifo.)
8. Golpee firmemente los pocillos sobre papel absorbente o toallitas de papel para eliminar todas las gotas de agua residuales.
9. Dispense 100 µL de reactivo TMB en cada pocillo. Mezcle suavemente durante 10 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente durante 20 minutos.
11. Detenga la reacción añadiendo 100 µL de solución de parada a cada pocillo.
12. Mezcle suavemente durante 30 segundos. **Compruebe que toda la coloración azul cambie a amarillo completamente.**
13. Lea la DO a 450 nm con un lector para pocillos de microtítulo **durante los siguientes 15 minutos.**

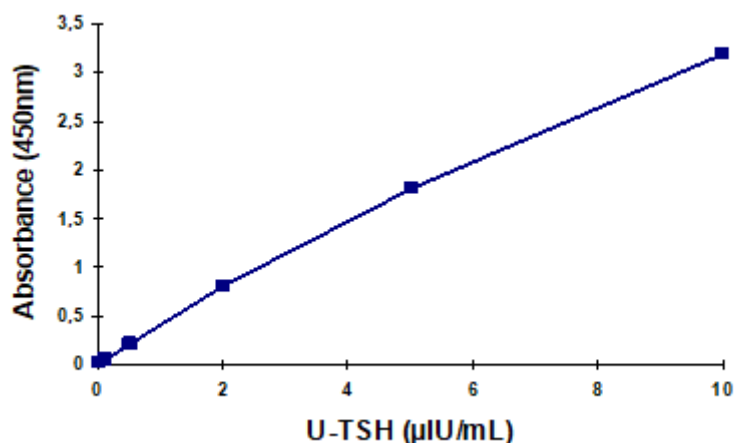
## 13 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule el valor de absorbancia promedio (A450) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras.
2. En un papel milimetrado, dibuje la curva estándar trazando la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia respecto a su concentración en µUI/mL, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Con el valor de la absorbancia media de cada muestra, determine la concentración correspondiente de TSH en µUI/mL a partir de la curva estándar. Según la experiencia y/o la disponibilidad de las funciones del ordenador pueden utilizarse otros métodos de reducción de datos.
4. Las muestras diluidas deben corregirse posteriormente con el factor de dilución apropiado.

### 13.1 Ejemplo de curva estándar

En el eje Y se muestran los resultados de una serie estándar típica con lecturas de absorbancia a 450 nm, mientras que en el eje X se muestran las concentraciones de TSH. Esta curva estándar es solamente para efectos ilustrativos y no debería utilizarse para cálculos desconocidos.

TSH (µUI/mL)	Absorbancia (450 nm)
0	0,009
0,1	0,050
0,5	0,218
2	0,801
5	1,800
10	3,191



#### 14 VALORES PREVISTOS

Cada laboratorio debería establecer su rango normal según su población de pacientes. Las diferencias en la técnica de ensayo y el uso de diferentes estándares puede incidir en los resultados.

Los resultados que figuran a continuación responden a 43 muestras de sangre normales y 73 muestras de sangre hipertiroides. Los rangos se determinan a partir de la media  $\pm$  2SD ( $\mu$ UI/mL TSH). Estos valores pueden diferir de otros datos publicados.

	Normal	Hipertiroidismo
n	43	73
Medio de TSH ( $\mu$ UI/mL)	1,84	< 0,07
Rango	0,54 - 4,72	< 0,07 – 0,20

#### 15 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

##### 15.1 Exactitud

U-TSH ELISA (EIA-1790) se ha comparado con la prueba Immulite 2000 TSH de 3ª generación de Diagnostic Products Corporation y es equivalente respecto a que los métodos utilizados son para la determinación cuantitativa de la TSH en suero humano. Asimismo, ambos métodos utilizan TSH calibrada y etiquetada en  $\mu$ UI/mL estandarizada según los valores de hTSH de la OMS (2º IRP, 80/558).

Se realizó un estudio con 62 muestras de pacientes con eutiroidismo e hipotiroidismo (determinadas según el análisis del laboratorio del hospital). El rango de muestras analizadas fue de 0,4  $\mu$ UI/mL a 62  $\mu$ UI/mL. La comparación demostró una buena correlación con otro kit comercial como se muestra a continuación:

N	= 62
Coefficiente de correlación	= 0,997
Pendiente	= 1,032
Intersección	= 0,240
Media de EIA-1790	= 8,31 $\mu$ UI/mL
Media de DPC	= 8,82 $\mu$ UI/mL

Otras 73 muestras de pacientes con hipertiroidismo también generaron una buena correlación con el kit de la prueba DPC:

	N.º de muestras [TSH] $\leq$ 0,1 $\mu$ UI/mL	# muestras [TSH] $\leq$ 0,4 $\mu$ UI/mL [TSH] > 0,1 $\mu$ UI/mL
DPC Kit	N = 71	N = 2
EIA-1790 Kit	N = 67	N = 6

Nota: las seis muestras de paciente con una concentración de TSH superior a 0,1  $\mu$ UI/mL en la prueba EIA-1790 mostraron concentraciones inferiores a 0,4  $\mu$ UI/mL, valor que se encuentra en el rango de hipertiroidismo (< 0,4  $\mu$ UI/mL).

## 15.2 Sensibilidad

Según el CV del 20% del interensayo de dos puntos de datos TSH de extremo bajo (0,07  $\mu\text{UI/mL}$  y 0,1  $\mu\text{UI/mL}$ ), se determinó la sensibilidad funcional del ensayo U-TSH en 0,054  $\mu\text{UI/mL}$ .<sup>9</sup>

## 15.3 Precisión

### 15.3.1 Precisión intraensayo

La precisión intraserie se determinó mediante réplicas de determinaciones de cinco muestras de suero distintas en un ensayo. A continuación se muestra la variabilidad intraensayo:

Muestra de suero	1	2	3	4	5
Número de réplicas	20	20	20	20	20
TSH media ( $\mu\text{UI/mL}$ )	0,11	0,26	0,49	3,90	9,68
Desviación estándar	0,01	0,02	0,04	0,25	0,74
Coefficiente de variación (%)	9,2	7,7	8,2	6,4	7,6

### 15.3.2 Precisión entre ensayos

La precisión entre series se determinó mediante réplicas de medidas de cinco muestras de suero distintas en una serie de ensayos calibrados individualmente. A continuación se muestra la variabilidad entre ensayos:

Muestra de suero	1	2	3	4	5
Número de réplicas	30	30	30	30	30
TSH media ( $\mu\text{UI/mL}$ )	0,11	0,31	0,48	3,96	8,89
Desviación estándar	0,02	0,04	0,04	0,31	0,68
Coefficiente de variación (%)	12,9	12,9	9,8	7,8	7,6

## 15.4 Recuperación y estudios de linealidad

### 15.4.1 Recuperación

Para cada concentración se combinaron dos muestras de suero de paciente con niveles conocidos de TSH y se analizaron por duplicado. La recuperación promedio fue del 104%.

Concentración prevista ( $\mu\text{UI/mL}$ )	Concentración observada ( $\mu\text{UI/mL}$ )	% recuperación
1,14	1,21	106%
1,65	1,75	106%
3,03	2,98	98%
4,56	4,58	100%
6,05	6,40	106%
13,20	13,90	105%

**15.4.2 Linealidad**

Se realizaron series de dilución de cuatro muestras con diluyente de muestras para determinar la linealidad. La recuperación promedio fue del 97,3%.

N.º	Dilución	Conc. prevista (µIU/mL)	Conc. observada (µIU/mL)	% previsto
1.	Sin diluir		14,6	
	1:2	7,30	7,26	99%
	1:4	3,65	3,38	93%
	1:8	1,83	1,66	91%
	1:16	0,91	0,79	87%
	1:32	0,46	0,39	85%
	1:64	0,23	0,19	83%
			Promedio = 90%	
2.	Sin diluir		14,2	
	1:2	7,10	7,22	102%
	1:4	3,55	3,41	96%
	1:8	1,78	1,95	110%
	1:16	0,89	1,00	112%
	1:32	0,44	0,46	105%
	1:64	0,22	0,23	105%
1:128	0,44	0,09	82%	
			Promedio = 102%	
3.	Sin diluir		3,49	
	1:2	1,75	1,80	103%
	1:4	0,87	0,93	107%
	1:8	0,44	0,48	109%
	1:16	0,22	0,24	109%
1:32	0,11	0,11	100%	
			Promedio = 106%	
4.	Sin diluir		2,56	
	1:2	1,28	1,19	93%
	1:4	0,64	0,62	97%
	1:8	0,32	0,29	91%
	1:16	0,16	0,14	88%
1:32	0,08	0,07	88%	
			Promedio = 91%	



### 15.5 Especificidad

Se analizaron las siguientes hormonas para la reactividad cruzada:

HORMONA ANALIZADA	CONCENTRACIÓN	INTENSIDAD EQUIVALENTE GENERADA para TSH ( $\mu\text{UI/mL}$ )
HCG — (1 <sup>er</sup> IRP 75/537 de la OMS)	1,000 mIU/mL	0
	5,000 mIU/mL	0
	10,000 mIU/mL	0
	50,000 mIU/mL	0
	100,000 mIU/mL	0
	250,000 mIU/mL	0
	500,000 mIU/mL	0
FSH — (2 <sup>o</sup> IRP-HMG de la OMS)	100 mIU/mL	0,00
	250 mIU/mL	0,00
	500 mIU/mL	0,10
	750 mIU/mL	0,18
LH — (1 <sup>er</sup> IRP 68/40 de la OMS)	100 mIU/mL	0,06
	250 mIU/mL	0,13
	500 mIU/mL	0,15
	750 mIU/mL	0,18
Prolactina — (1 <sup>er</sup> IRP 75/504 de la OMS)	100 ng/mL	0
	250 ng/mL	0
	500 ng/mL	0
	750 ng/mL	0
	1000 ng/mL	0
hGH — (1 <sup>er</sup> IRP 65/217 de la OMS)	50 ng/mL	0
	100 ng/mL	0
	200 ng/mL	0
	400 ng/mL	0

### 15.6 Efecto gancho

No se ha observado efecto gancho en el ensayo con concentraciones de TSH de hasta 1000  $\mu\text{UI/mL}$ .

## 16 CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren analizar las muestras de control de calidad (controles) con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo. Para garantizar el rendimiento adecuado debería analizarse un número estadísticamente significativo de controles para establecer los valores medios y los rangos aceptables. No deben utilizarse controles que contengan azida sódica.

## 17 ESTANDARIZACIÓN

Los estándares de referencia TSH se calibran con relación a la segunda preparación de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud de hTSH 2<sup>o</sup> IRP-80/558).
















## 18 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento del ensayo se realice con un completo conocimiento de las instrucciones del boletín técnico y según las buenas prácticas de laboratorio.
- Para uso profesional solamente. Los resultados obtenidos con este kit solamente deberían utilizarse como complemento a otros procedimientos de diagnóstico e información que tenga el médico.
- Las muestras de suero con muestras de lipemia en bruto, hemólisis en bruto o turbidez no deben utilizarse con la prueba.
- El procedimiento de lavado es fundamental. Un lavado insuficiente dará lugar a una precisión insuficiente y lecturas de absorbancia elevadas.
- El ensayo U-TSH (EIA-1790) no se ha probado en recién nacidos, por lo que no debe utilizarse para el cribado de recién nacidos.
- Si el dispositivo no funciona, utilice un procedimiento de diagnóstico alternativo o consulte con el fabricante.

## 19 REFERENCIAS

1. Marshall, J.C.: Clinic. In Endocrinol. Metab., 4:545 (1975).
2. Jeffcoate, S.L.: Clinic. In Endocrinol. Metab. 4: 521 (1975).
3. Cohen, K.L.: Metabolism, 26:1165 (1977).
4. Shome, B. and Parlow, A.F.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:199 (1974).
5. Lundy, L.E., Lee, S.G., Levy, W., et. al: Obstet. Gynecol., 44:14 (1974).
6. Catt, K.J. and Pierce, J.G.: Reprod. Endocrinol., Chapter 2, Ed: S.S.C. Yen and R.B. Jaffe, Philadelphia (1978).
7. Leonard, J.M., Leach, R.B., Couture, M. and Paulsen, C.A.: J. Clin. Endocrinol., 34:209 (1972).
8. USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.
9. Spencer, C.A., et. al., Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. Clin. Chem. 42:1 (1996).

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade